

На правах рукописи

КОЛЕСНИКОВА
Татьяна Дмитриевна

**ПРОСТРАНСТВЕННО-ВРЕМЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ РЕПЛИКАЦИИ В
ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМАХ ДРОЗОФИЛЫ**

03.01.07 – молекулярная генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Новосибирск – 2021

Работа выполнена в лаборатории молекулярной цитогенетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук (ИМКБ СО РАН), г. Новосибирск

Официальные оппоненты:

Пасюкова Елена Генриховна, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией ФГБУ Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», г. Москва

Груntenко Наталия Евгеньевна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск

Лебедев Игорь Николаевич, доктор биологических наук, профессор РАН, заместитель директора, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск

Ведущее учреждение:

ФГБУН Институт биологии гена Российской академии наук, г. Москва

Защита состоится: «___» _____ 2022 г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.074.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте молекулярной и клеточной биологии СО РАН в конференц-зале по адресу 630090, Новосибирск, пр. академика Лаврентьева, 8/2; тел: +7-383-373-02-49; e-mail: ovant@mcb.nsc.ru С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.mcb.nsc.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

О. В. Антоненко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Синтез ДНК в эукариотических клетках происходит на стадии S-фазы клеточного цикла. У большинства организмов транскрипционно активный хроматин реплицируется в первой половине S-фазы, а молчащий хроматин реплицируется поздно. Пространственно-временная картина репликации является важной эпигенетической характеристикой клеток. Она является наследуемой и стабильной в поколениях клеток одной линии дифференцировки, в то время как в эмбриогенезе и при дифференцировке является динамичной, отражая соответствующее эпигенетическое состояние. Нарушения точной последовательности репликации генома приводит к геномной нестабильности, нарушениям конденсации хромосом, когезии сестринских хроматид и часто наблюдается при злокачественной трансформации клеток.

Геном эукариот организован в структурно-функциональные домены, имеющие определенное положение в ядре, одновременно вступающие в репликацию и, в некоторых случаях, скоординированно поддерживающие активный или неактивный транскрипционный статус. Предполагается, что именно время репликации такого домена в S-фазе является важным механизмом эпигенетического наследования его хроматинового состава в клеточных поколениях, и, как следствие, регуляции экспрессии генов у эукариот. Более того, предполагается, что изменение времени репликации хроматинового домена в онтогенезе может быть важным механизмом инактивации, то есть, программирования молчащего состояния района для последующих клеточных поколений. Таким образом, исследование эпигенетической регуляции репликации ДНК, в частности, регуляции последовательности репликации генома, является очень актуальным и активно разрабатываемым направлением.

Политенные хромосомы (ПХ) слюнных желез дрозофилы являются уникальной моделью интерфазной хромосомы. Их гигантский размер позволяет визуализировать процессы репликации и транскрипции, изучать на цитологическом уровне распределение хромосомных белков и картировать гены. Для политенных хромосом характерен рисунок поперечных полос – так называемых дисков и междисков, что многие годы используется для тонкого картирования различных цитогенетических маркеров. В дисках ДНК находится в очень компактном состоянии, в то время как в междисках ДНК значительно декомпактизована. До последнего времени вопрос о соответствии этих морфологических структур и молекулярной карты генома дрозофилы оставался

открытым. В результате, не было возможности сопоставить данные по морфологии хромосом и данные по картированию на геномном уровне различных хроматиновых белков и других особенностей хроматина. Многолетние исследования, проводимые в лабораториях молекулярной цитогенетики и хромосомной инженерии ИМКБ СО РАН, привели к прорыву в данной области исследований (см. Zhimulev et al., 2014). В последнее время стало понятно, что выявляемая цитологически организация поличенных хромосом отражает организацию генома дрозофилы и его консервативную в разных тканях упаковку (Vatolina et al., 2011, Zhimulev et al., 2014, Kolesnikova et al., 2018). Именно консервативность свойств хроматиновых доменов, соответствующих хорошо выявляемым в световой микроскоп морфологическим структурам поличенных хромосом в разных тканях дрозофилы, позволяет экстраполировать результаты, полученные цитологически на поличенных хромосомах, на другие клетки. Биоинформатический анализ распределения междисковых белков позволил подразделить геном дрозофилы на четыре дискретных типа хроматина, названных «aquamarine», «lazurite», «malachite» и «ruby» (Zhimulev et al, 2014, Boldyreva et al., 2017). Хроматин aquamarine в культурах клеток значительно обогащен всеми белками, характерными для междисков ПХ, в частности, белком CHRIZ/CHROMATOR, белками и модификациями гистонов, характерных для открытого хроматина, комплексами ремоделинга хроматина и транскрипционными факторами. Хроматин lazurite отличается отсутствием CHRIZ. Он обогащен белками, участвующими в элонгации транскрипции и, как правило, в нем лежат тела активных генов (Boldyreva et al., 2017). Хроматин ruby характеризуется отсутствием междиск-специфических белков, соответствует молчащим типам хроматина в культурах клеток (типы хроматина по данным: Filion et al., 2010, Kharchenko et al., 2011), обогащен белками Lamin, SUUR и белками, связанными с Polycomb-сайленсингом (Zhimulev et al., 2014, Boldyreva et al., 2017, Khoroshko et al., 2016). Хроматин malachite, вероятно, соответствует универсальным переходным зонам между парами контрастных состояний хроматина. Он обогащен инсуляторными белками CP190, SU(HW) и mod 2.2 (Khoroshko et al., 2016). Оказалось, что распределение в геноме четырех типов хроматина тесно связано с морфологией ПХ, что делает ее перспективным инструментом для установления геномных координат дисков и их границ.

Еще в семидесятые годы XX века было впервые проведено картирование временных параметров репликации ДНК в поличенных хромосомах слюнных

желез. Для такого картирования применялось импульсное мечение ^3H тимидином. Такой подход давал достаточно низкое разрешение, был длительным и трудоемким. Современные подходы к визуализации репликации – антитела к белкам репликационной вилки, меченые аналоги нуклеотидов нового поколения, таких как 5- этинил-2'-дезоксинуридин (EdU), микроскопия сверхвысокого разрешения, позволяют достичь очень высокого качества цитологического картирования реплицирующихся сайтов и одновременно позволяет локализовать хроматиновые белки. Применение таких подходов к ПХ является очень перспективным. В то же время, политенные хромосомы возникают в очень специфическом клеточном цикле, эндоцикле. Такой цикл имеет особенности, не свойственные диплоидным клеткам: выход из S-фазы до завершения репликации всего генома приводит к недорепликации последовательностей ДНК, реплицирующихся последними. Само по себе наличие недорепликации говорит об изменении работы системы контроля за повреждениями ДНК. В этих клетках выключен механизм апоптоза (Hassel et al., 2014); скорость движения репликационных вилок и скорость репликации выделенных районов генома существенно ниже, чем в диплоидных клетках; гены, связанные с репликацией ДНК экспрессируются на относительно низком уровне; не известно, происходит ли в принципе в этих клетках активация поздних ориджинов репликации (Lee, Davidson, Duronio 2009, Sher et al., 2013, Maqbool et al., 2010, Edgar et al., 2014). Для дальнейшего использования модели политенных хромосом и интерпретации полученных результатов требуется детальный анализ пространственно-временной организации репликации и ее регуляции в клетках с политенными хромосомами.

Важной особенностью ПХ является недорепликация гетерохроматиновых последовательностей. Мутация $SuUR^{ES}$ приводит к полной супрессии недорепликации в интеркалярном гетерохроматине и частичной политенизации прицентромерного гетерохроматина (Belyaeva et al., 1998). Недавно было показано, что консервативный белок Rif1 также влияет на политенизацию в ПХ и может взаимодействовать с белком SUUR (Munden et al., 2018). Исследование механизма действия белков SUUR и Rif1 на недорепликацию, а также поиск новых факторов, влияющих на степень представленности поздно реплицирующейся ДНК в ПХ, позволяет существенно расширить знания о регуляции поздней репликации.

Цели и задачи работы. Целью работы было исследование пространственно-временной организации репликации в политенных хромосомах слюнных желез *D. melanogaster*, ее связи с организацией генома,

исследование молекулярных механизмов действия белка SUUR и поиск новых факторов, влияющих на репликационный тайминг в политенных хромосомах дрозофилы. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. На базе модели четырех состояний хроматина разработать подход для картирования видимых в световой микроскоп дисков политенных хромосом, характеризующихся высокой компактностью (черных дисков). Прокартировать все черные диски в ПХ 2R.

2. Разработать новые подходы для исследования репликации в ПХ СЖ. Получить детальное расписание репликации всех прокартированных дисков в политенных хромосомах слюнных желез при помощи иммунодетекции репликационных вилок антителами к белку PCNA.

3. Используя данные по геномному картированию репликационного тайминга в культурах клеток из ранее опубликованных работ, сопоставить временную организацию репликации в ПХ и хромосомах диплоидных клеток.

4. Используя данные по экспрессии генов, генной онтологии, локализации хроматиновых белков в хромосомах культуральных клеток и хромосомах СЖ, провести исследование молекулярной организации доменов ПХ, характеризующихся поздней репликацией в S-фазе.

5. Исследовать особенности эволюции порядка генов и последовательностей ДНК в районах наиболее поздней репликации – районах интеркалярного гетерохроматина.

6. Исследовать динамику связывания SUUR с хромосомами в ходе эндотикла, исследовать необходимость гистона H1 для связывания SUUR с хроматином, исследовать эффект избытка SUUR на репликацию ДНК в ПХ.

7. Исследовать влияние мутаций в генах *Rif1* и *Su(var)3-9*⁰⁶ на время репликации гетерохроматиновых последовательностей в ПХ СЖ.

Научная новизна. Впервые получены геномные координаты всех компактных (то есть, большинства видимых в световой микроскоп) дисков целого плеча политенной хромосомы. Проведено цитологическое картирование последовательности репликации дисков ПХ с недостижимым ранее разрешением. Проведено детальное сопоставление опубликованных ранее геномных профилей репликации в диплоидных клетках и репликационных паттернов, наблюдаемых в ПХ. Показано, что около 60% эухроматиновых плеч соответствует районам, сходным по многим свойствам и ИГХ – районам недорепликации ПХ, ранее считавшихся очень специфическими районами хромосом, «более гетерохроматиновыми», чем основная масса эухроматина. Впервые показано, что в основе репликационного тайминга у дрозофилы лежит

чередование в геноме дрозофилы двух типов доменов, соответствующих морфологическим структурам ПХ – черным дискам и интервалам между ними. Выдвинута и экспериментально подтверждена модель, объясняющая логику смены репликационных паттернов в ПХ и связь этих паттернов с событиями, происходящими на уровне последовательности ДНК. Впервые показано, что районы поздней репликации соответствуют участкам генома с консервативным порядком генов, обогащены высоко консервативными некодирующими последовательностями и характеризуются особым паттерном эволюции генов. В рамках исследования механизма действия белка SUUR обнаружены новые свойства этого белка, а именно: показано, что связывание SUUR с хроматином динамично в клеточном цикле, впервые экспериментально показана роль гистона H1 в связывании SUUR с ПХ. Выявлены новые факторы, оказывающие влияние на время репликации и, как следствие, недорепликацию отдельных районов ПХ: белок Rif1, гистон H1 и гистонметилтрансфераза Su(VAR)3-9.

Теоретическая и практическая значимость. Получение геномных координат всех компактных (то есть, большинство видимых в световой микроскоп) дисков целого плеча политенной хромосомы, а также разработка алгоритма для дальнейшего картирования дает в руки исследователей уникальную возможность сопоставлять результаты, полученные цитологическими методами на ПХ, с координатами на геномной карте и, соответственно, с данными по локализации эпигенетических маркеров, полученными при помощи геномных технологий.

Наши разработки по детальному анализу паттернов репликации в ПХ и соотношению цитологических данных с геномной картой дрозофилы делают ПХ очень удобной моделью для исследования динамики связывания белков с хромосомами в ходе S-фазы.

Выявление в геноме дрозофилы достаточно протяженных участков, которые, с одной стороны, сохраняют синтению в эволюции, с другой стороны, соответствуют структурно-функциональным доменам определенного типа, дает в руки исследователей интересный инструмент для изучения эволюции геномов.

Результаты работы позволяют обобщить и переосмыслить большой массив имеющихся к настоящему времени данных по доменной организации хроматина и репликации в хромосомах дрозофилы. Они также показывают, что политенные хромосомы дрозофилы являются блестящей визуализацией организации эукариотического генома, консервативной между дрозофилой и

млекопитающими, и сохраняют свою актуальность в качестве модели исследования пространственно-временной организации репликации.

Некоторые результаты работы использованы в курсе лекций «Материальные основы наследственности», читаемом автором на четвертом курсе Факультета естественных наук Новосибирского Национального Исследовательского Государственного Университета.

Положения, выносимые на защиту. Дисковый рисунок политенных хромосом отражает разделение генома *Drosophila* на два глобальных типа доменов с контрастными свойствами, которое консервативно в разных тканях и определяет репликационный тайминг у дрозофилы. Эти два типа доменов соответствуют разным морфологическим структурам ПХ – черным дискам и интервалам между ними, представленным чередованием серых дисков и междисков. Черные диски ПХ, характеризующиеся наличием хроматина *guby*, соответствуют 60% эухроматиновой части хромосомы 2R, по размеру они лежат в диапазоне 15-500 тпн. Черные диски характеризуются низкой плотностью генов и содержат преимущественно тканеспецифические гены. В разных тканях они представлены молчащими типами хроматина. Границы черных дисков хорошо соответствуют границам топологических доменов и границам зон обогащения H3K27me₃, белками SUUR и LAMIN.

Существует значительное сходство пространственно-временной организации репликации в ПХ и хромосомах диплоидных клеток. В обоих типах хромосом интервалы между черными дисками соответствуют зонам ранней инициации репликации. Внутри черных дисков события инициации репликации практически отсутствуют, и репликация в них идет преимущественно от краев к середине. Наблюдается корреляция между временем окончания репликации и размером диска.

Районы поздней репликации являются зонами с консервативным порядком генов и характеризуются низким уровнем разрывов синтении. Они обогащены высоко консервативными некодирующими последовательностями, что позволяет сформулировать гипотезу о наличии в этих районах сложной сети регуляторных элементов, определяющей высокую консервативность порядка генов в этих районах. В пределах рода *Drosophila* районы ИГХ сохраняют в эволюции низкую плотность распределения генов и репрессивный статус хроматина, оставаясь такими же молчащими, поздно реплицируемыми доменами.

Белок SUUR динамично связывается ПХ в ходе эндоцикла, во время поздней S-фазы его локализация совпадает с локализацией PCNA.

Белок Rif1 влияет на репликацию гетерохроматиновых районов политенных хромосом, в том числе на протяженные блоки сателлитной ДНК, и это влияние почти не затрагивает время активации ориджинов, но определяет вероятность их активации.

Степень достоверности и апробация результатов. Все результаты, полученные в ходе выполнения работы, достоверны, что подтверждается логическим обоснованием выводов и согласованностью результатов данной работы с результатами, полученными другими научными группами. Основные результаты были представлены на более чем двадцати международных конференциях, симпозиумах и конгрессах в России, США, Италии и Китае, Бразилии и Франции, в том числе были сделаны устные доклады на международной конференции "Дрозофила в генетике и медицине" (Гатчина, Россия, 2020), 14 международной конференции по гетерохроматину дрозофилы (Сполето, Италия, 2019), 26th Wilhelm Bernhard Workshop on the Cell Nucleus (Дижон, Франция, 2019), 25th Wilhelm Bernhard Workshop on the Cell Nucleus (Нижний Новгород, Россия, 2017), 13th International conference on Drosophila heterochromatin (Кальяри, Италия, 2017), Международной мини-конференции "Chromosomes and Mitosis – 2016" (Новосибирск, Россия, 2016), Международной конференции «Хромосома» (Новосибирск, Россия, 2009, 2012, 2015), 12 международной конференции по гетерохроматину дрозофилы (Палермо, Италия, 2015), BIT's 5th Annual World Congress of Molecular & Cell Biology (Нанкин, Китай, 2015), 8-й, 9-й и 10-й международных конференциях по гетерохроматину дрозофилы (Губбио, Италия, 2007, 2009, 2011).

Вклад автора. Все основные результаты, вошедшие в диссертацию, получены автором лично как в индивидуальных, так и коллективных исследованиях. Все выводы и теоретические обобщения сделаны автором самостоятельно. Цитологические исследования ПХ делались в сотрудничестве с И. Ф. Жимулевым, Е. Н. Андреевой, Е. С. Беляевой, А. А. Юрловой, Д. С. Бебякиной, Д. А. Калашниковой, О. В. Демаковой, Г. В. Похолковой, Л. В. Болдыревой. Биоинформатическая часть работы сделана совместно с Ф. М. Гончаровым и И. В. Макуниным, Д. Ю. Прокоповым. Разработанный автором подход для установления геномных координат гb-дисков политенных хромосом *D. melanogaster* базируется на результатах, полученных И. Ф. Жимулевым, Е. С. Беляевой, Ф. П. Гончаровым, Т. Ю. Зыковой. Отработка метода молекулярного комбинга проводилась совместно с А. В. Иванкиным и С. А. Демаковым. Часть работы по анализу репликации в политенных хромосомах слюнных желез *D. melanogaster* проводилась совместно с Е. Н. Андреевой, О. В. Демаковой, Г. В.

Похолковой, Д. А. Калашниковой и А.В. Колодяжной. Микродиссекция и создание микродиссекционных библиотек проведено совместно с С. А. Романенко. Работы по эволюции районов поздней репликации сделаны совместно с И. В. Макуниным и Н. Г. Андреевской. Исследования механизма действия белка SUUR проводили совместно с Е. Н. Андреевой, О. В. Посух, Д. С. Бебякиной, Е. С. Беляевой. Анализ эффектов оверэкспрессии SUUR, его фрагментов и мутантов проводили совместно с Е. Н. Андреевой, Д. С. Калашниковой, А. А. Юрловой. Работы по исследованию влияния гистона H1 на связывание SUUR с хроматином и репликацию ДНК проводили совместно с Е. Н. Андреевой, Д. В. Федоровым и группой исследователей из Медицинского колледжа им. Альберта Эйнштейна, Бронкс, Нью-Йорк. Микроскопия сверхвысокого разрешения проводилась совместно с Ф. Шубертом, в институте генетики растений и исследования сельскохозяйственных культур им. Лейбница (IPK) (Гатерслебен, Германия).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из семи глав: «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Разработка подхода для установления геномных координат черных дисков политенных хромосом. Картирование *rb*-дисков хромосомы 2R», «Цитологическое исследование репликации в политенных хромосомах», «Исследование молекулярной организации *rb*-дисков - доменов хромосом *D. melanogaster*, характеризующихся поздней репликацией в S-фазе», «Особенности эволюции порядка генов в поздно реплицирующихся доменах генома дрозофилы», «Поиск молекулярных механизмов действия белка SUUR – регулятора репликационного тайминга в политенных хромосомах слюнных желез. Новые факторы, влияющие на репликационный тайминг в политенных хромосомах». Объем диссертации составляет 246 машинописных страниц, включая 68 рисунков, четыре таблицы, шесть приложений. Список литературы содержит 351 ссылку.

Публикации по теме диссертации. По теме диссертации опубликовано 25 статей в рецензируемых международных и отечественных журналах (все статьи опубликованы в журналах из списка, рекомендованного Перечнем ВАК РФ) и 2 главы в книге.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1 «Пространственно-временная организация репликации ДНК в геномах эукариот» является обзором литературы по теме диссертации и содержит информацию о факторах, влияющих на репликационный тайминг.

Вводятся понятия ориджинов репликации и репликационных доменов, обсуждаются механизмы инициации репликации. Сопоставляются разные методологические подходы для картирования сайтов инициации репликации. Обсуждаются понятия ранней/поздней репликации и ранних/поздних ориджинов. Рассматриваются факторы, влияющие на скорость движения репликационных вилок. Подробно рассматривается информация по репликационному таймингу у дрозофилы, в первую очередь, данные, полученные при помощи геномных технологий. Вторая часть главы посвящена описанию экспериментальной модели – политенным хромосомам дрозофилы. Подробно описаны новые подходы к установлению соответствия морфологии ПХ и геномной карты. Обсуждаются результаты старых работ по исследованию репликации на модели ПХ при помощи радиоавтографии. Отдельная часть посвящена белку SUUR.

Глава 2 «Материалы и методы исследования» включает подробное описание использованных материалов и методик. Отмечено, что в работе использованы следующие линии *D. melanogaster*: Oregon R (линия дикого типа, Bloomington Stock Center), *w;SuUR* (Belyaeva et al., 1998), *w^{m4}*; *Su(var)3-9⁰⁶ SuUR* (Andreyeva et al., 2007), *4xSuUR⁺* (Zhimulev et al. 2003), *UAS-SuUR* (Volkova et al., 2003); *UAS-SuUR*; *Sgs3-GAL4* (Kolesnikova et al., 2011), *Tub-GAL4*, *hsp70-GAL4*, *da-GAL4* (Bloomington Stock Center), *Sgs3-GAL4* (Cherbas et al., 2003), *UAS-PCNA-RNAi* (Vienna Drosophila Research Center), *UAS-His1-dsRNA-10-3* (Siriaco et al. 2009), *UAS-His1-dsRNA-10-3* (Siriaco et al. 2009), *hsp70-CycE* (Knoblich et al., 1994).

Методики приготовления препаратов политенных хромосом, флуоресцентная гибридизация *in situ* и иммуноокрашивание политенных хромосом подробно описаны в статьях (Kolesnikova et al., 2011, 2013, 2018, 2020). В работе использованы следующие антитела: кроличьи поликлональные антитела к белку SUUR (E-45, Makunin et al., 2002) (1:50); кроличьи поликлональные антитела к γ -H2AX (Madigan et al., 2002) (1:100); мышинные моноклональные антитела к белку PCNA (PC10, Abcam, ab29) (1:500); мышинные моноклональные антитела к гистонам H1 (1:100) и H2A (1:100) (любезно предоставлены Х. Саумвебером), мышинные моноклональные антитела к CHRIZ (Gortchakov et al., 2005) (1:30); полученные в морской свинке антитела к белку DUP (любезно предоставлены Т. Опп-Вивер) (1:500). Полученные в мыши антитела к BrdU (Becton Dickinson, USA) специфично связываются как с CldU, так и с JdU (Anglana et al., 2003).

В работах по исследованию динамики репликационных вилок в ходе S-фазы в клетках слюнных желез, а также динамике распределения белков в эндоцикле,

использовали иммуноокрашивание ПХ антителами к белку PCNA (Kolesnikova et al., 2013, Andreyeva et al., 2017). В отдельных экспериментах репликацию ДНК в ПХ визуализировали при помощи включения BrdU, IdU, EdU, а также методом молекулярного комбинга (Ivankin et al., 2011).

Включение BrdU и IdU в ДНК ПХ описано в статьях Kolesnikova et al., 2013, Demakova et al., 2007. Для включения в ДНК и детекции EdU, мы использовали набор Click-iT EdU Alexa Fluor 488 Imaging Kit (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Цитологический анализ проводили с помощью люминесцентного микроскопа Olympus BX51 (Japan), оборудованного масляно-иммерсионным объективом 100×/1.30 Uplan FI Ph3 и цифровой камерой Olympus DP70. Для анализа репликации и ультраструктуры хромосом с разрешением выше классического дифракционного предела ~ 250 нм была применена трехмерная микроскопия со структурированным освещением (3D-SIM) с использованием микроскопической системы Zeiss Elyra PS.1 и программное обеспечение ZEN Black (Carl Zeiss GmbH).

При картировании дисков ПХ на геномной карте мы опирались на детальную цитологическую карту хромосомы 2R (Bridges & Bridges, 1939) в сочетании с электронно-микроскопической картой Saura et al. 1986, 1991 (<http://www.helsinki.fi/~saura/EM/>). Координаты генов брали из базы данных FlyBase (release 5 version 57). Данные по экспрессии генов брали из двух источников: данные проекта modENCODE (Graveley et al., 2011) (данные на Март 2016) и проекта FlyAtlas (Chintapalli et al., 2010). Данные по репликационному таймингу в клетках Kc и Cl8 (Schweiger et al., 2009) загружали с сайта <http://www.replicationdomain.com/>. Профили распределения хроматиновых белков загружали из базы данных GEO. Координаты хроматиновых и физических доменов брали из онлайн-приложений к статьям Hou et al., 2012, Sexton et al., 2012, Ulyanov et al., 2012, Eagen et al., 2015, Zhimulev et al., 2014, Kharchenko et al., 2011, Fillion et al., 2010. Пики обогащения белком CHRIZ в хромосомах культуральных клеток по данным проекта ModEncode брали на сайте <http://modencode.org/>. Для визуализации данных использовали UCSC genome browser (Meyer et al. 2013). Для обработки данных, построения и визуализации графиков использовали базовый функционал языка R (R-Team, 2011), а также Excel. Для анализа генной онтологии, мы пользовались Gorilla Tool (Eden et al., 2009). Для статистической обработки использовали базовый функционал языка R (R Development Core Team 2012). Эволюционный

анализ проводили при помощи UCSC Table Browser и Galaxy (Giardine et al. 2005).

Глава 3 «Разработка подхода для установления геномных координат черных дисков политенных хромосом. Картирование всех черных дисков хромосомы 2R» посвящена установлению соответствия между морфологическими структурами ПХ и молекулярной картой генома *D. melanogaster*. Мы воспользовались моделью четырехцветного хроматина для установления геномных координат черных дисков и доказали, что все черные диски характеризуются наличием хроматина *guby*. Мы поставили задачу прокартировать все черные диски политенной хромосомы 2R, априори принимая следующие допущения: 1) все черные диски обязательно содержат хроматин *guby* 2) все междиски соответствуют хроматину аквамарин. Для предварительной грубой локализации *guby* -содержащих дисков (rb-дисков) на геномной карте, выделялись все участки генома, содержащие хроматин *guby* и ограниченные хроматином аквамарин. Далее мы проводили последовательные этапы коррекции первичного грубого предсказания. На **Рис.1** дана общая схема основных этапов картирования. На **Рис. 2** можно увидеть результат картирования на примере района 43F-46A.

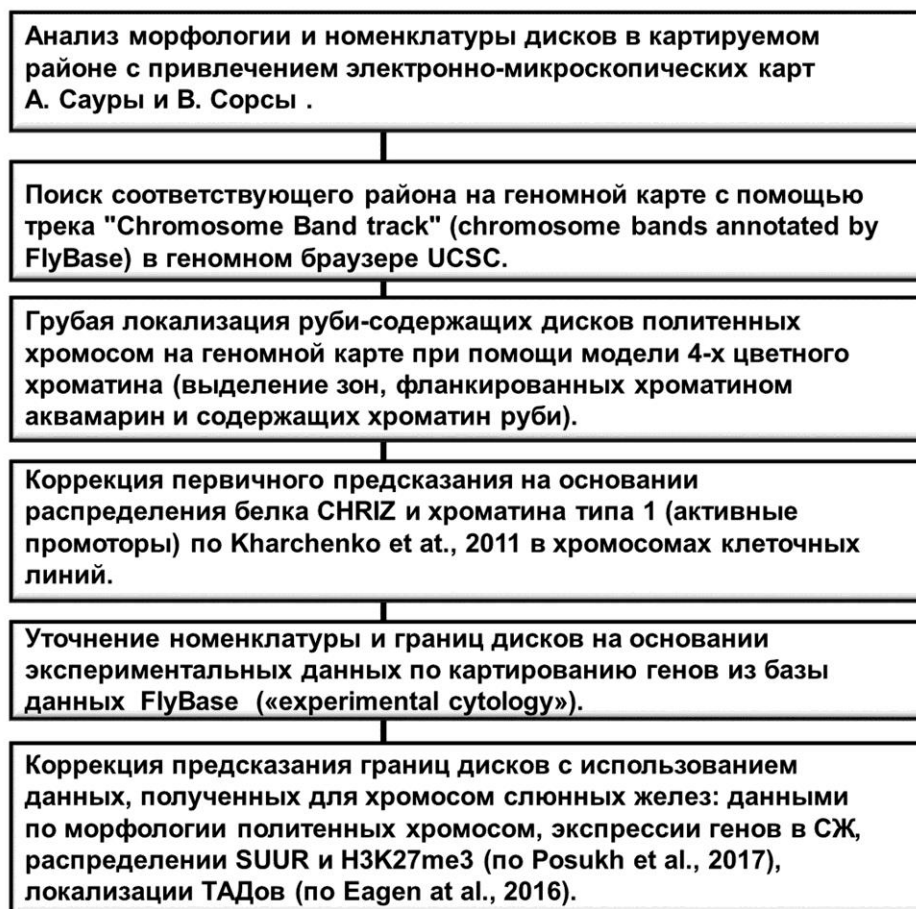


Рисунок 1. Общая схема основных этапов картирования черных дисков ПХ.

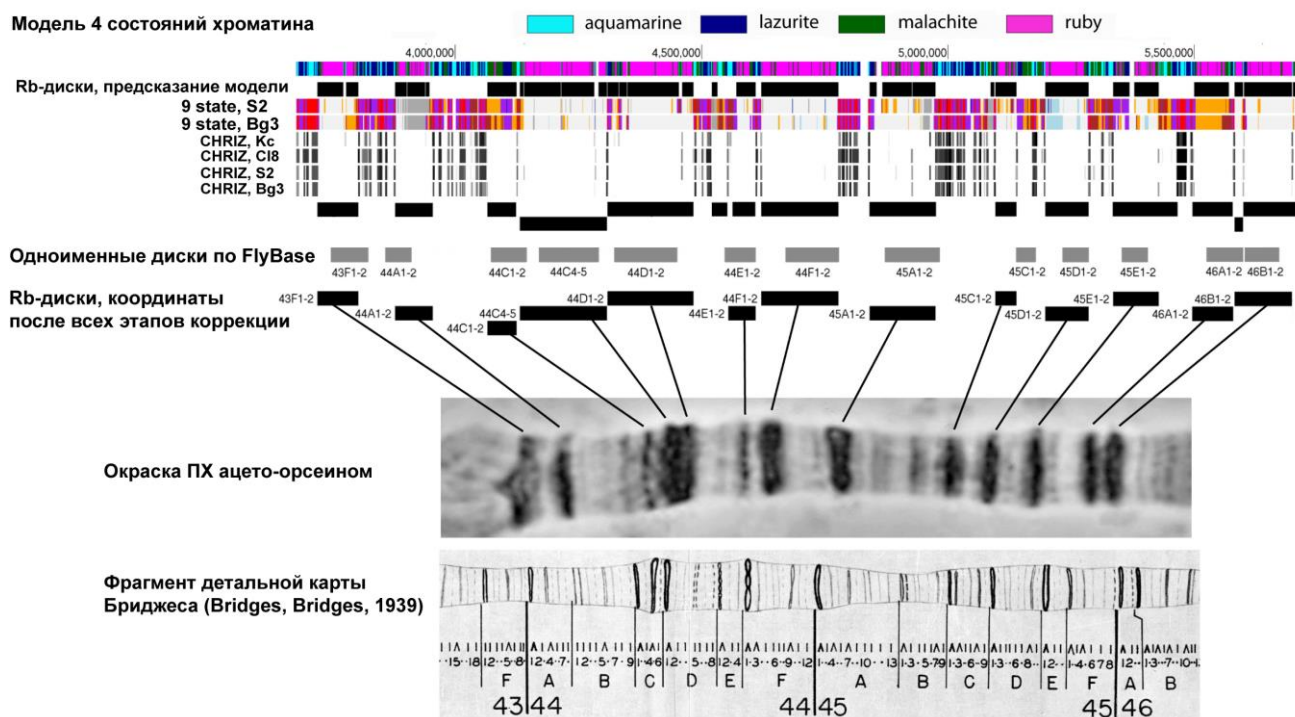


Рисунок 2. Локализация черных дисков из районов 43F-46A политенной хромосомы 2R на молекулярной карте генома *D. melanogaster*

Для того чтобы установить, какому конкретно диску карты Бриджеса соответствует каждый предсказанный диск, мы действовали в несколько этапов. Сначала мы ориентировочно определяли район хромосомы, используя цитологическую карту, опубликованную в базе данных FlyBase (Drysdale, 2008). Ранее было показано, что разрешение этой карты позволяет грубо локализовать наиболее крупные диски (Vatolina et al., 2011). Далее мы воспользовались данными по экспериментальному картированию индивидуальных генов, которые экстрагировали из базы данных FlyBase в виде единой таблицы. Такие данные доступны для 640 генов хромосомы 2R. Для того, чтобы каждому предсказанному диску поставить в соответствие название диска карты Бриджеса, пользовались электронно-микроскопическими картами, полученными Саурой и Сорсой. На этих картах каждому диску, видимому на ЭМ фотографии, ставится в соответствие диск рисованной карты Бриджеса (Saura, 1986, Saura et al., 1991, Bridges, Bridges, 1939).

На этапе сопоставления предсказанных дисков и дисков, выявляемых в ПХ, мы вводили следующий уровень коррекции положения и границ предсказанных *rb*-дисков. В тех случаях, когда морфология политенных хромосом полностью соответствовала предсказанию, и положение предсказанных границ не противоречило данным по экспериментальному картированию генов, координаты границы были приняты окончательными и вносились в таблицу. В

тех случаях, когда паттерн предсказанных дисков не соответствовал морфологии или данным по экспериментальному картированию, мы проводили коррекцию положения границы, привлекая данные по экспрессии генов и локализации белков в слюнных железах. Важно отметить, что во всех случаях границу диска проводили по фрагменту хроматина aquamarin. Всего в хромосоме 2R было прокартировано 159 черных дисков (ruby-дисков, rb-дисков). Их общая длина составляет 11,6 мпн, что составляет 60% эухроматиновой части хромосомы 2R. Длина дисков варьирует в пределах 15 - 500 тпн.

Глава 4 «Цитологическое исследование репликации в ПХ слюнных желез». В начале главы описаны методические разработки автора – адаптация различных современных подходов к цитологическому исследованию репликации ДНК для исследования репликации в ПХ слюнных желез. Проанализированы частоты ядер в СЖ, находящихся на разных стадиях эндоцикла в зависимости от возраста и температуры развития личинок.

Далее описывается исследование репликационного тайминга всех rb-дисков хромосомы 2R. Нам удалось выделить шесть относительно дискретных паттернов окрашивания антителами к PCNA, соответствующих последовательно сменяющим друг друга стадиям эндоцикла, которые были названы: ER – ранняя репликация, и LR1-LR5 – Late Replication 1-5. Каждому из прокартированных дисков мы поставили в соответствие стадию, на которой этот диск заканчивает репликацию (**Рис. 3**). Полученные результаты по последовательности выхода из репликации дисков политенных хромосом хорошо согласуются со всеми ранее опубликованными данными и позволяют обобщить их. Чем позднее диск заканчивает репликацию, тем большему числу критериев поздней репликации он удовлетворяет. Диски, заканчивающие репликацию последними, соответствуют классическим районам интеркалярного гетерохроматина (ИГХ), то есть, районам недорепликации в политенных хромосомах. Важно отметить, что любое подразделение дисков политенных хромосом на рано и поздно реплицирующиеся является условным, так как зависит от выбранного критерия. Существенным различием нашего подхода к цитологическому картированию репликации от подходов, применявшихся в работах других авторов (Zhimulev, 1999; Pavan, 1959; Rudkin, Woods, 1959; Mishra, Lakhotia, 1982; Zhimulev et al., 2003) является то, что мы не пытались приписать геномные координаты каждому индивидуальному сигналу репликации, который может захватывать одновременно несколько соседних дисков одновременно. Мы в первую очередь выделили индивидуальные диски, приписали им геномные координаты, а затем пытались поставить диску в соответствие стадию S-фазы, на которой диск

заканчивает репликацию (стадию, на которой в диске перестает выявляться сигнал PCNA). Это позволило существенно улучшить разрешение цитологического анализа репликационного тайминга и привязать результаты к геномным координатам.

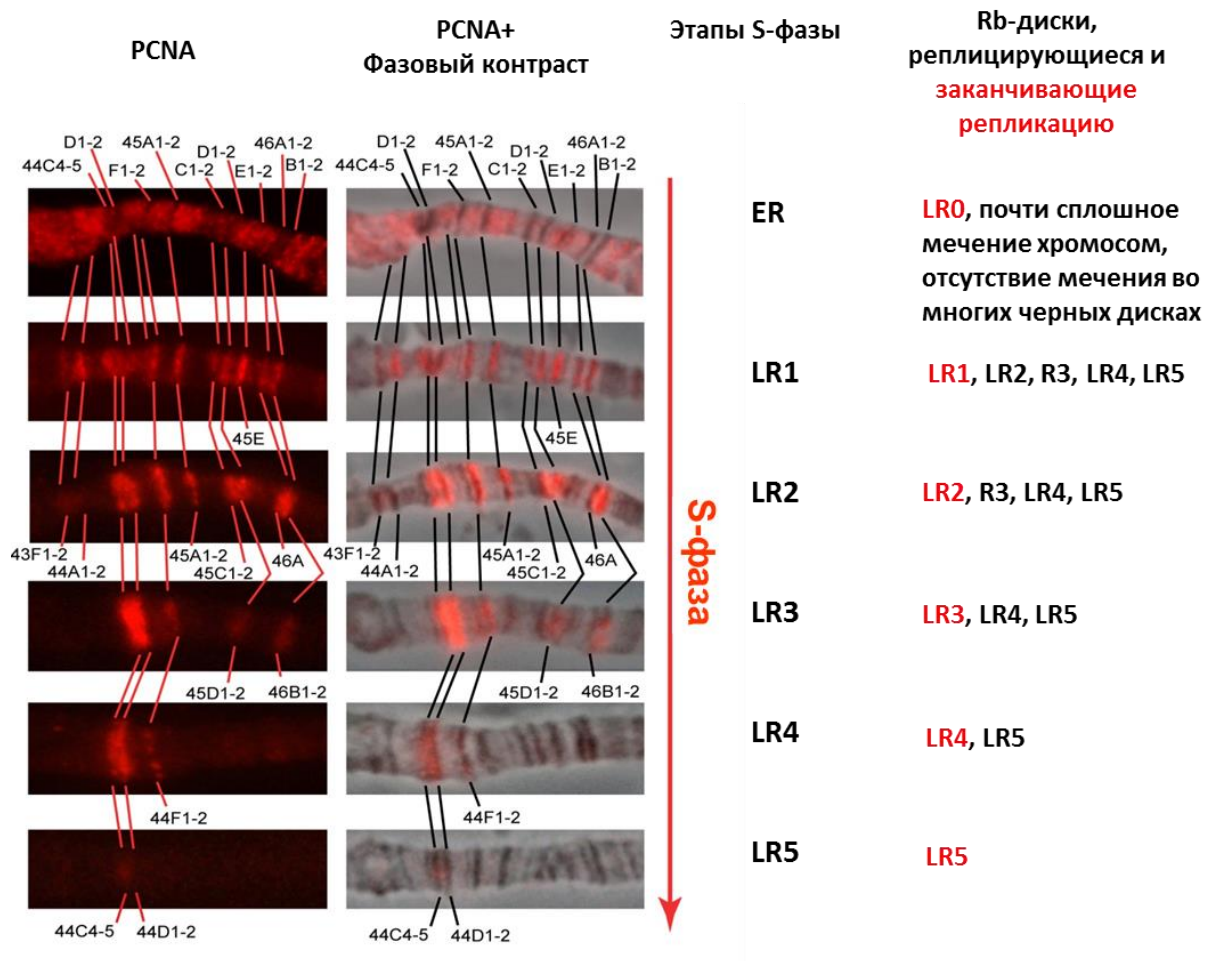


Рисунок 3. Цитологическое картирование сайтов связывания антител к белку PCNA позволяет разбить S-фазу эндосикла на 6 субстадий и подразделить гб- диски на группы по времени окончания репликации.

Прокартировав расписание репликации гб-дисков, мы получили возможность сопоставить репликационный тайминг в ПХ и диплоидных клетках. Мы показали, что последовательности ДНК, соответствующие гб-дискам ПХ, имеют тенденцию реплицироваться в соответствующем порядке в культурах клеток. Кроме того, мы определили среднее время репликации в клетках Кс всех последовательностей из индивидуальных дисков и интервалов между ними (ИНТ) (**Рис. 4**). ИНТ в среднем демонстрируют достоверно более раннюю репликацию, чем картированные диски. Группы дисков LR0-1, LR2-3 и LR4-5 также достоверно различались по среднему времени репликации. Распределение значений наиболее поздней репликации показывает, что самая поздняя репликация приходится в клетках Кс на участки, соответствующие наиболее

поздно реплицирующимся диском (**Рис. 4**). Можно сделать вывод, что на уровне разрешения, соответствующего черным дискам и промежуткам между ними, районы хромосом реплицируются и заканчивают репликацию в ПХ в том же порядке, что и в диплоидных клетках.

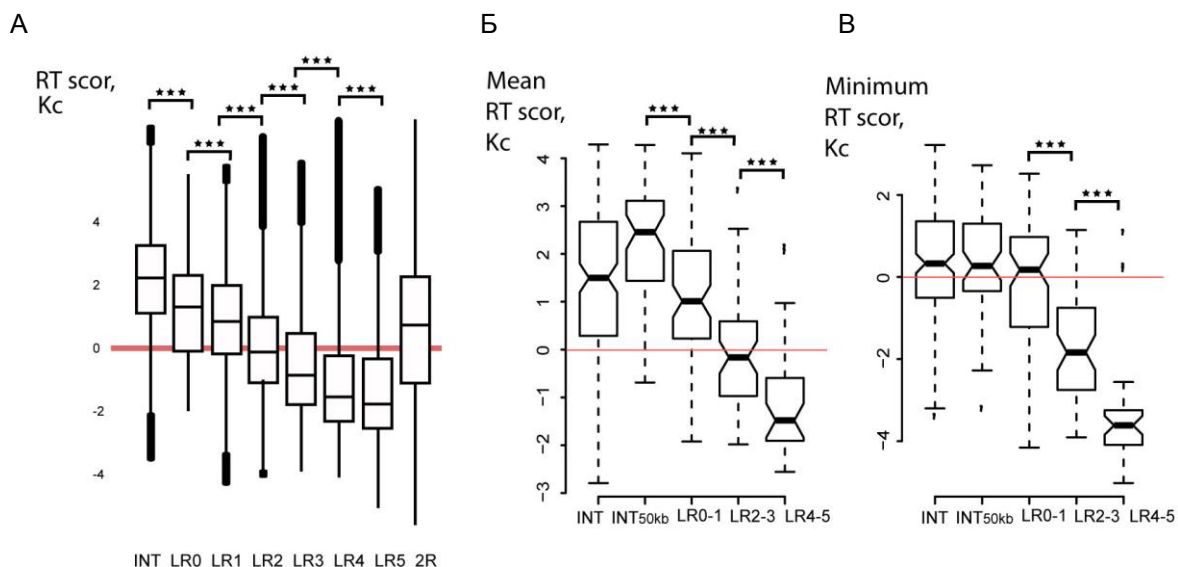


Рисунок 4. А Боксплот, показывающий распределение по времени репликации в клетках Кс всех последовательностей ДНК, соответствующих интервалам между гб-дискам, дискам из групп LR0-LR5 и всему анализируемому участку хромосомы 2R. Все группы достоверно отличаются (p -value < E-100, критерий Mann-Whitney). **Б, В.** Боксплоты с распределением средних (Б) и минимальных (В) значений для всех интервалов между гб-дисками и гб-дисков, разбитых на три группы в соответствии со временем окончания репликации в ПХ слюнных желез (LR0-1, LR2-3, LR4-5) *** p value < E-5 (критерий Манна-Уитни). По оси у: значения параметра, отражающего время репликации по данным Schwaiger et al., (2009).

Мы построили усредненные профили репликации в клетках Кс в окрестностях границ дисков, разделенных на классы LR0-1, LR2-3 и LR4-5 (**Рис. 5**). Во всех трех случаях мы видим градиент времени репликации от границы диска внутрь, при этом минимум наблюдается на расстоянии около 100 кб для LR4-5, около 50 кб для LR2-3 и менее 50 кб для LR0-1. Такой характер усредненного профиля репликации находится в соответствии с различиями в размерах дисков из разных групп. Коэффициенты корреляции между размером диска и усредненным временем его репликации были рассчитаны как -0,47 и -0,51 (p value < E-10) для клеток Кс и Cl8 соответственно.

Можно сделать вывод, что в диплоидных клетках в гб-дисках лежат локальные минимумы на профилях репликации, в то время как локальные максимумы на профилях репликации лежат вблизи границ гб-дисков, но

сдвинуты за их пределы. Такой профиль репликации соответствует теоретически предсказанному U-образному профилю, где район, лишенный ранних ориджинов репликации, окружен протяженными зонами инициации репликации, где лишь единичные ориджины иницируют репликацию в каждом клеточном цикле (Petryk et al, 2016). Этот вывод хорошо подтверждается графиками (**Рис. 5**), где данные по относительному времени репликации (RT scor) нормализованы на медианную длину дисков в группах LR1-0 (красный), LR2-3 (зеленый), LR4-5 (синий профиль) и ИНТ (фиолетовый профиль). С моделью единичных событий инициации репликации в пределах интервалов между *rb*-дисками хорошо согласуется и характерный размер репликонов - 80 кб, порождаемых зонами ранней инициации репликации (Schwaiger et al, 2009).

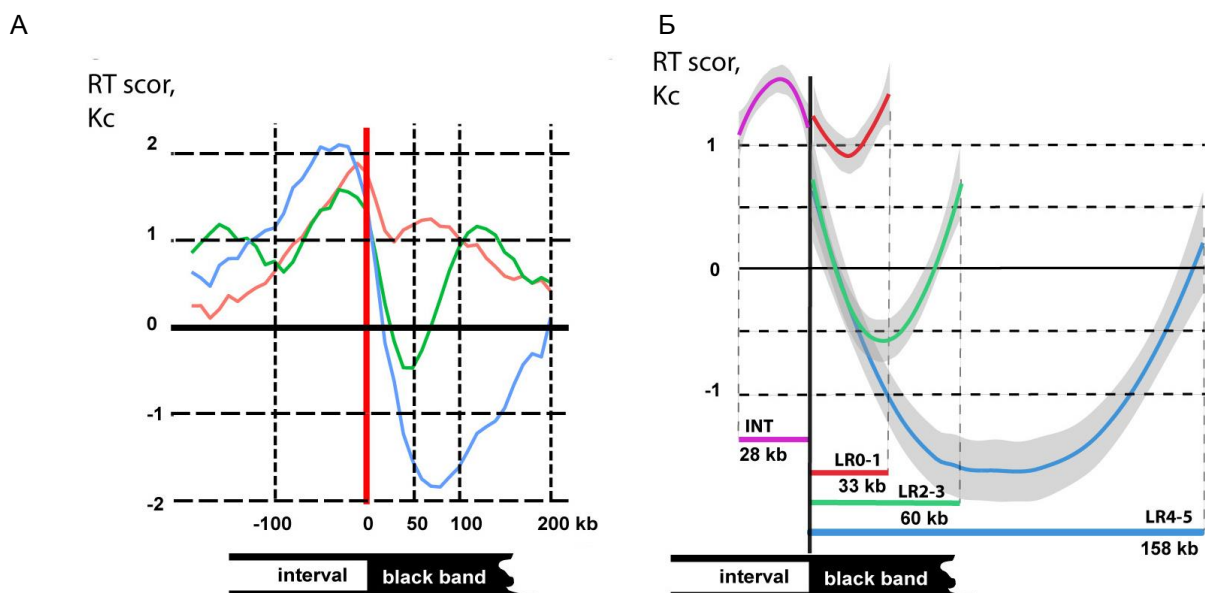


Рисунок 5. А. Усредненные значения времени репликации в клетках Кс для всех последовательностей ДНК, лежащих на одинаковом расстоянии (шаг 1 тпн) от границы диск/интервал. Отдельные кривые соответствуют дискам из групп LR0-1 (красная кривая), LR2-3 (зеленая кривая), LR4-5 (синяя кривая). Б. Усредненные значения времени репликации в клетках Кс в *rb*-дисках и интервалах между ними, нормализованных по длине, соответствующей медианному размеру диска в группе (28 кб для ИНТ, 33 кб для LR0-1, 60 кб для LR2-3 и 158 кб для LR4-5). А, Б. По оси X – расстояние от границы диска, по оси у - значения параметра, отражающего время репликации по данным Schwaiger et al., (2009).

На основании анализа ранее опубликованных и собственных данных, мы выдвинули модель организации репликации у дрозофилы (**Рис. 6**). Характерный размер репликационных доменов у дрозофилы, соответствующих черным дискам ПХ и интервалам между ними, сопоставим с характерным размером репликона. В результате, домены ранней репликации являются

зонами инициации, а домены поздней репликации – это зоны, где события инициации репликации достаточно редки. Чередование этих двух типов доменов соответствует чередованию различных морфологических структур ПХ. Эти домены варьируют по размеру, но редко превышают несколько сот кб. В диплоидных клетках эти относительно короткие домены реплицируются вилками, приходящими от оридженов из пограничных зон ранней инициации – ИНТ и успевают закончить репликацию раньше, чем наступает классическая «поздняя S-фаза», когда активируются поздние ориджины. Таким образом, репликация большей части эухроматиновых плеч *D. melanogaster* в классическом смысле можно отнести к ранней репликации. Только наиболее протяженные диски и районы прицентромерного гетерохроматина иницируют репликацию в поздней S-фазе.

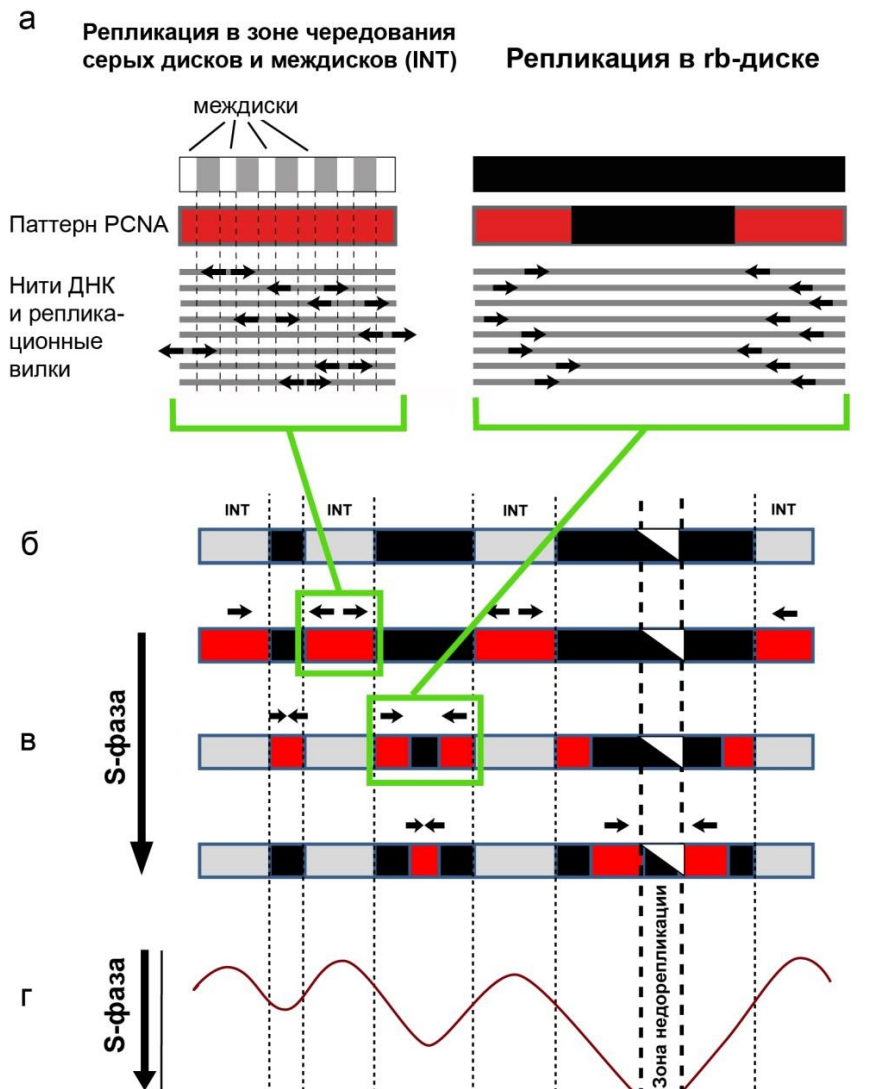


Рисунок 6. Модель, иллюстрирующую логику смены паттернов в ПХ и связь этих паттернов с событиями, происходящими на уровне последовательности ДНК.

Вероятно, важнейшим различием при сравнении репликации в ПХ и диплоидных клетках является различие в скорости репликации во время поздней S-фазы – существенная часть генома не успевает реплицироваться при сопоставимой длине S-фазы. Было показано, что в ПХ скорость движения репликационных вилок во время поздней S-фазы в среднем десять раз ниже, чем во время ранней S-фазы (Lakhotia & Sinha, 1983), что не характерно для диплоидных клеток дрозофилы. Вероятно, именно поэтому, несмотря на то, что некоторые *rb*-диски короче прилежащих интервалов, мы видим паттерн, когда все черные диски одновременно реплицируются. Репликация в этих дисках продолжается до тех пор, пока вилки, идущие с двух сторон, не встретятся. В наиболее протяженных *rb*-дисках вилки не успевают встретиться до конца S-фазы и наблюдается недорепликация (Рис. 7).

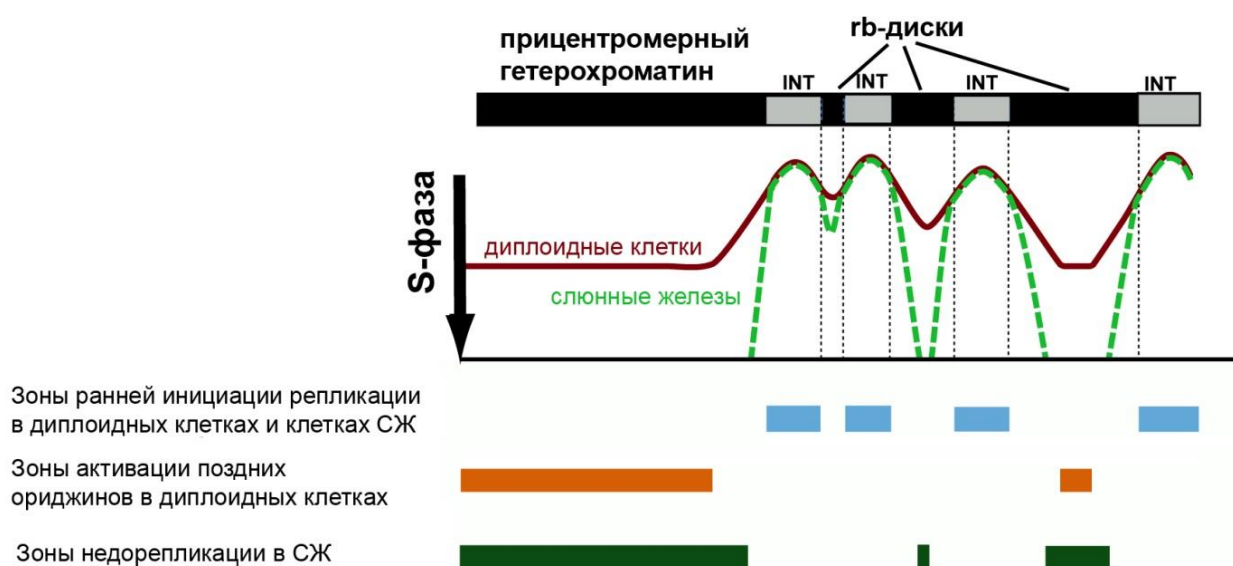


Рисунок 7. Модель, иллюстрирующая сходства и различия репликационного тайминга в ПХ и хромосомах диплоидных клеток.

Для прямой проверки гипотезы о вероятностном характере инициации репликации в ИНТ ПХ мы использовали микроскопию сверхвысокого разрешения 3D-SIM. На препаратах ПХ личинок дикого типа на стадии очень ранней репликации все сигналы EdU были приурочены к интервалам между компактными дисками, однако интервалы существенно отличались по общей интенсивности сигнала EdU (рис. 8). Грубо все варианты локальных сигналов EdU можно разделить на два типа: 1) яркие, как правило, парные, сигналы, сконцентрированные в виде полос, перпендикулярных оси хромосомы, 2) относительно редкие точечные сигналы, равномерно распределенные по всему

ИНТ. На **Рис. 9** приведен пример ИНТ, в котором при окрашивании хромосом ДАПИ отчетливо видны тонкие диски, что доказывает, что молекулы ДНК выровнены относительно оси хромосомы. Сигналы EdU распределены случайным образом в объеме ИНТ, что особенно хорошо видно на трехмерных реконструкциях (Kolesnikova et al., 2021). Такое распределение сигналов подтверждает нашу гипотезу о том, что на разных нитях ДНК политенной хромосомы репликационные сигналы выявляются в разных участках относительно геномной карты.

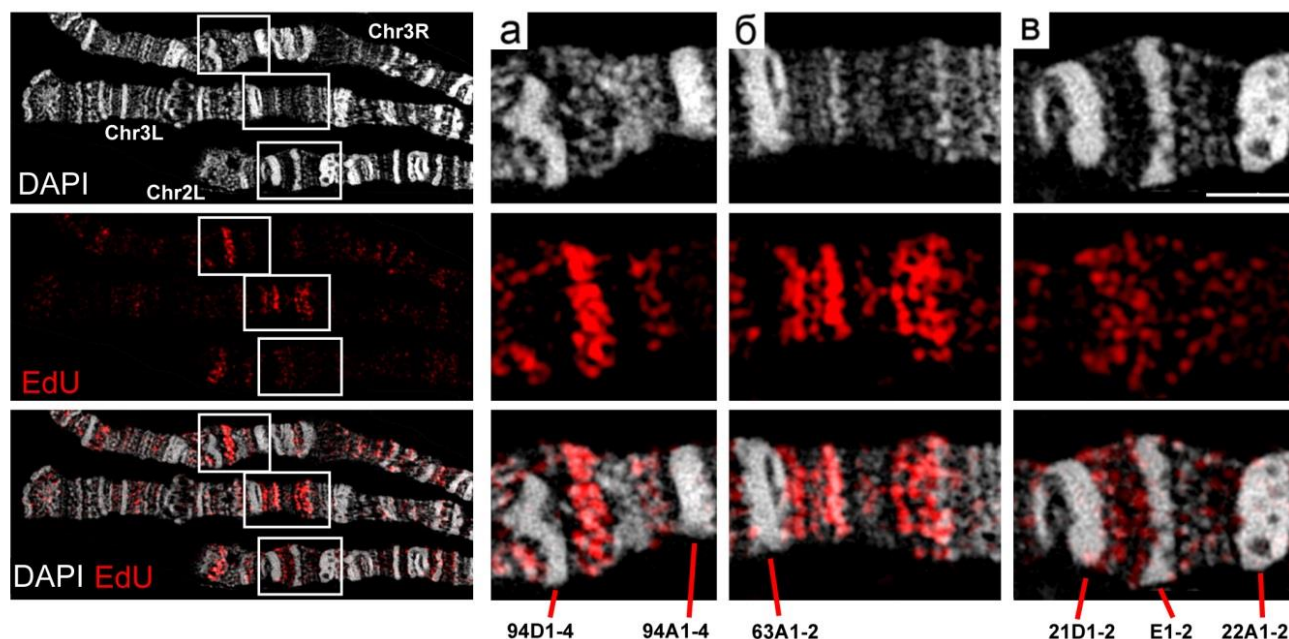


Рисунок 8. Два типа репликационных сигналов, выявляемых в политенных хромосомах на стадии очень ранней репликации. Масштаб 2 мкм.

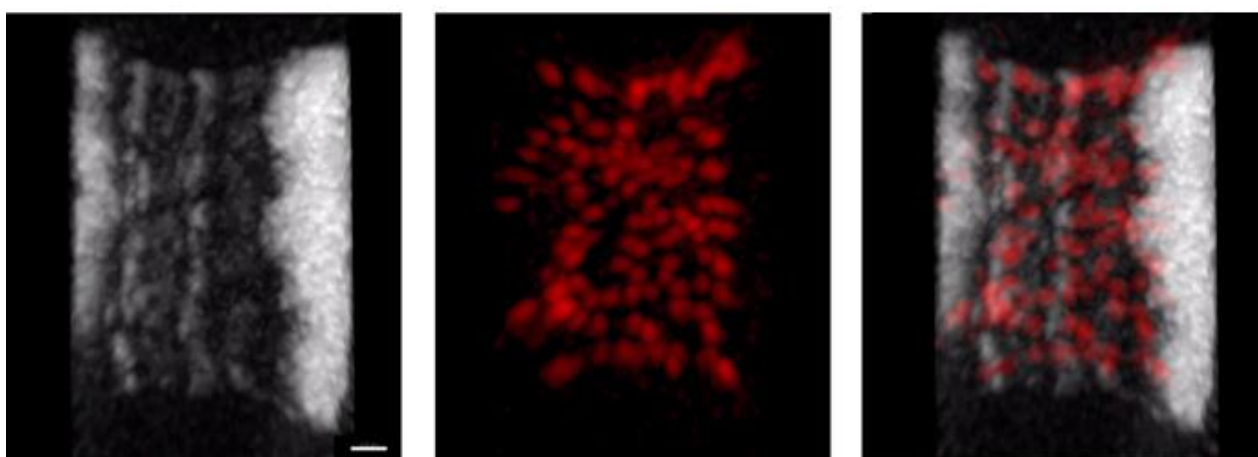


Рисунок 9. ИНТ 21E1-2/22A1-2 на стадии очень ранней репликации. Белый сигнал – ДАПИ окрашивание, красный – EdU. Масштаб 0,5 мкм.

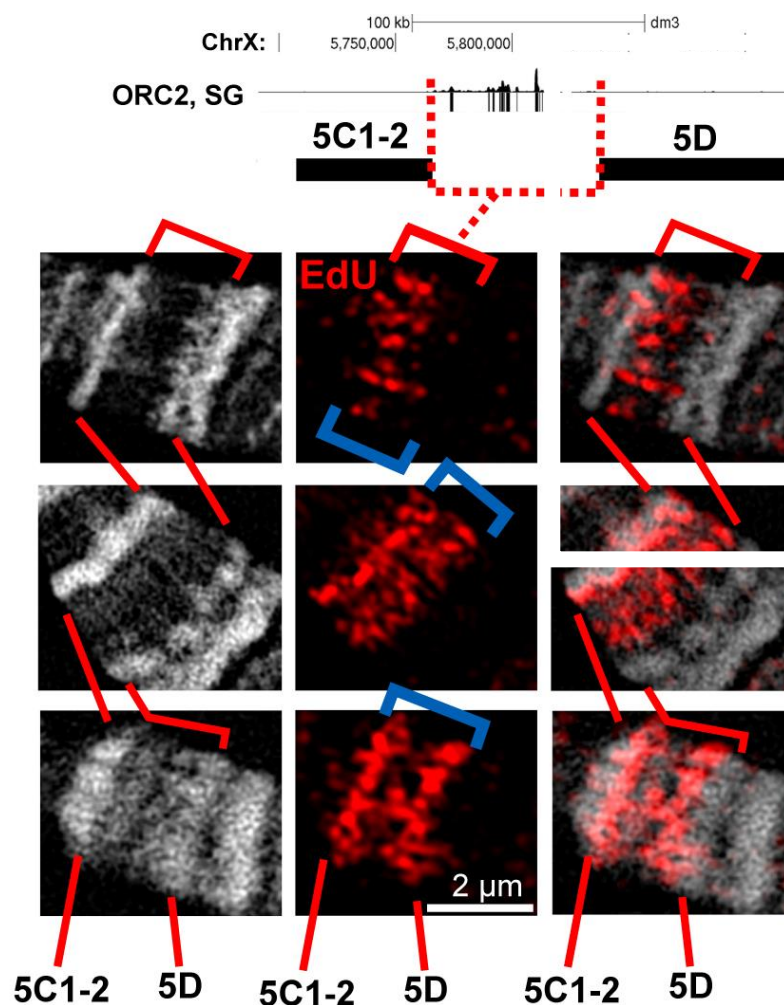


Рисунок 10. Динамика репликации в ИНТ 5C1-2/5D в первые 20 минут индуцированной S фазы. Сверху приведены геномные координаты дисков, фланкирующих ИНТ, и распределение сайтов связывания белка ORC2 в СЖ (по Sher et al., 2012).

Чтобы получить больше информации об инициации репликации в политенных хромосомах и выявить временную динамику ранней S-фазы, мы синхронизировали клетки слюнных желез, индуцируя S-фазу при помощи эктопической экспрессии циклина E. Для этого мы использовали линии *D. melanogaster*, несущие трансген *hsp70-CycE* (Knoblich et al., 1994). Мы показали, что после 30-минутного теплового шока с температурой 35°C (мы выяснили, что температура шока играет решающее значение при необходимости достичь высокой синхронизации) у поздних личинок 3-го возраста и 0-часовых предкуколок *hsp70-CycE SuUR* через 70 мин в слюнных железах начинают выявляться ядра на стадии очень ранней репликации. Еще через 20 минут доля меченых ядер на препаратах достигает 100% (при 20% в контроле без теплового шока). Это говорит о том, что все клетки, не реплицирующие ДНК, вступают в индуцированную S-фазу, при этом сдвиг по времени вступления не превышает

20 минут. Таким образом, анализ препаратов через 90 мин после теплового шока позволяет сделать выводы о временной динамике репликации в течение первых 20 минут S-фазы.

Для примера на **Рис. 10** приведены последовательные паттерны включения EdU в первые 20 минут S фазы для ИНТ 5C1-2/5D хромосомы X. На левой фотографии, соответствующей самому раннему паттерну, сигнал виден как множество точек, разбросанных в ИНТ. На следующей стадии по краям INT обнаруживаются парные яркие сигналы EdU, при этом внутри продолжают выявляться диффузные сигналы. На третьей хромосоме почти все сигналы сосредоточены по краям. На **Рис. 10** вверху приведено распределение сайтов связывания белка пререпликационного комплекса ORC2 по данным Sher et al., 2012. Можно видеть, что множественные сайты связывания ORC2 лежат в левой половине ИНТ, точно также самые ранние диффузные сигналы EdU в этом ИНТ сдвинуты влево. Таким образом, мы считаем, что самый ранний репликационный паттерн позволяет делать выводы о характере инициации репликации, в то время как более поздние паттерны связаны с быстрым движением вилок репликации вдоль по хромосоме после инициации репликации. Сходную динамику смены паттернов мы наблюдали и в других районах политенных хромосом. Важно отметить, что разные ИНТ инициировали репликацию с разной скоростью. Некоторые ИНТ инициировали репликацию на большинстве нитей ДНК уже в первые минуты S фазы, здесь мы видели наиболее яркие парные сигналы уже через 20 минут после начала S-фазы. Другим требовалось более часа для инициации репликации на всех нитях ДНК. Таким образом, мы полностью подтвердили сформулированную выше гипотезу, согласно которой инициация репликации в политенных хромосомах происходит в интервалах между компактными дисками, при этом внутри этих интервалов инициация носит вероятностный характер.

Глава 5. «Исследование молекулярной организации черных дисков - доменов хромосом *D. melanogaster*, характеризующихся поздней репликацией в S-фазе». Долгие годы районы ИГХ, выделенные на основании свойства недорепликации, рассматривали как особые, более «гетерохроматиновые», участки хромосомных плеч (Belyaeva et al., 2008, Khoroshko et al., 2016). Анализ свойств gb-дисков показал, что эти диски обладают многими свойствами, описанными для районов ИГХ, в то время как интервалы между ними обладают контрастными свойствами. Гены, попадающие в диски, имеют тенденцию экспрессироваться в небольшом

диапазоне тканей, и по Gene ontology эти районы обогащены тканеспецифичными генами. В интервалах же между черными дисками преобладают гены с высоким уровнем экспрессии в большинстве тканей, взятых нами в анализ. Rb-диски представлены сочетанием молчащих типов хроматина и имеют резкий перепад в распределении хроматиновых белков, в частности, SUUR, гистон H1, LAMIN, H3K27Me3 на границе (**Рис.11**). Наши результаты говорят о том, что политенные хромосомы дрозофилы являются блестящей визуализацией организации эукариотического генома, консервативной между дрозофилой и млекопитающими. Чередование черных дисков и промежутков между ними, представленных серыми дисками и междисками отражает подразделение генома на два глобальных типа доменов с контрастными свойствами.

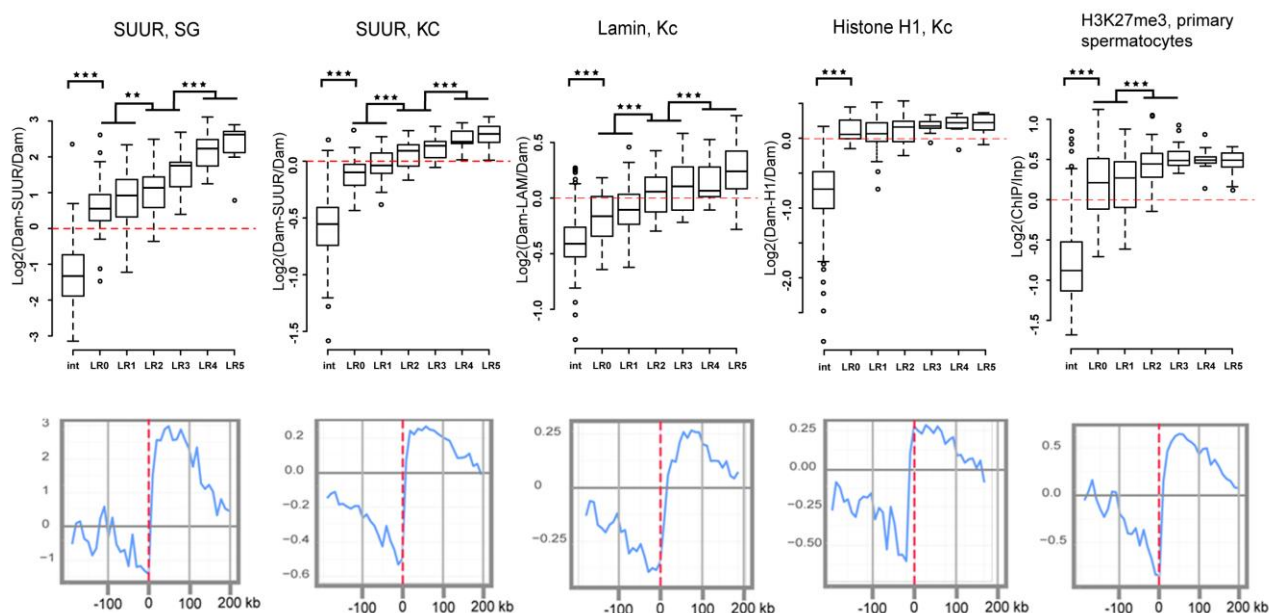


Рисунок 11. Анализ представленности белков- маркеров молчащих типов хроматина, в ИНТ, Rb-дисках и на их границах. Маркеры: SUUR в СЖ (по Maksimov et al., 2014), SUUR в клетках Кс (по Filion et al., 2010), LAMIN в клетках Кс (по van Bemmel et al., 2010), гистон H1 в клетках Кс (по Filion et al., 2010), H3K27Me3 в первичных сперматocyтах (по El-Sharnouby et al., 2017). Все Rb-диски достоверно отличаются от ИНТ ($***p < E-14$, $**p < E-3$; критерий Манна-Уитни). Снизу приведено усредненное распределение соответствующих значений на границах дисков. Граница соответствует положению 0. Вправо - направление внутрь диска, влево – наружу от диска.

Глава 6 «Особенности эволюции поздно реплицирующихся районов генома дрозофилы». Определение границ районов интеркалярного гетерохроматина (ИГХ) на геномном уровне позволило исследовать вопрос эволюционной консервативности этих районов. В качестве показателя

консервативности мы использовали размеры синтенных блоков, выявленных при сравнении геномов девяти видов рода *Drosophila* (Von Grotthuss et al., 2010). Для построения синтенных блоков были использованы не гены напрямую, а «независимые генные якоря» (independent gene anchors, или IGA), которые не учитывают размеров гена. Каждый из якорей соответствует одному гену или группе физически связанных (перекрывающихся) генов и считается одной эволюционной единицей (Von Grotthuss et al., 2010). В состав синтенных блоков вошли 9193 IGA, включающие в себя 10733 гена. Мы показали, что синтенные блоки, пересекающие районы ИГХ, включают в себя в среднем большее количество генов. Кроме того, мы обнаружили, что гены внутри района ИГХ имеют тенденцию составлять единый синтенный блок, и границы такого синтенного блока часто практически соответствуют границам самого района ИГХ. Таким образом, мы предположили, что районы ИГХ характеризуются пониженной плотностью точек разрывов хромосомных перестроек. В целом наши данные хорошо согласуются с работой (Ranz et al., 2012), демонстрирующей, что районы, связывающие белки SUUR и LAMIN, обладают в среднем большей эволюционной стабильностью, чем районы, не связывающие эти белки.

Для проверки гипотезы о консервативности порядка генов в районах ИГХ мы проанализировали соответствие между районами ИГХ и 22 районами, которые были выделены авторами работы (Von Grotthuss et al., 2010) как ультраконсервативные районы (УКР) — синтенные блоки с максимальным количеством генов (20—46 IGAs). Оказалось, что только 3 УКР не локализируются в позднореплицируемых районах. Это подтверждает склонность синтенных блоков с большим количеством генов располагаться в районах ИГХ. Однако далеко не все районы ИГХ пересекаются с синтенными блоками, содержащими большое количество генов. Это вполне ожидаемо, если принять во внимание, что для районов ИГХ характерна пониженная плотность генов. Учитывая обнаруженную нами корреляцию расположения ИГХ и синтенных блоков с большим количеством генов, мы предположили, что районы ИГХ склонны содержать не просто синтенные блоки с повышенным содержанием генов, а физически длинные синтенные блоки. Чтобы проверить это предположение, мы отсортировали синтенные блоки по физической длине в геноме *D. melanogaster* и показали, что из 2683 блоков все 30 самых длинных соответствуют районам поздней репликации в политенных хромосомах СЖ. При этом 12 наиболее длинных блоков из самой вершины списка (383—704 т. п. о.) демонстрируют недорепликацию. Кроме того, мы обнаружили, что

содержание синтенных блоков, длиной более 100 т. п. о. в ИГХ примерно в 5 раз выше, чем в среднем по геному. Таким образом, можно сделать вывод о том, что расположение физически длинных синтенных блоков коррелирует с районами ИГХ еще более явно, чем расположение синтенных блоков с большим содержанием генов. Таким образом, мы видим, что районы ИГХ эволюционно консервативны с точки зрения порядка генов. Мы показали, что районы недорепликации обогащены ультра-консервативными элементами и высоко консервативными некодирующими последовательностями. Особенно часто такие последовательности выявляются в интронах очень длинных генов. Эти результаты указывают на наличие сложной регуляторной сети в этих районах, что может быть причиной высокой консервативности в них порядка генов.

Мы проанализировали особенности эволюции ДНК в 60 районах недорепликации политемных хромосом дрозофилы и обнаружили, что эти районы содержат высокую долю генов, не имеющих гомологов в геномах комара и человека. Это указывает на корреляцию между временем репликации гена, состоянием хроматина соответствующего хромосомного локуса и эволюционной консервативностью этого гена. Мы показали, что для генов *Drosophila*, лежащих в зонах недорепликации и не имеющих гомологов в геноме человека, характерна высокая скорость накопления несинонимичных замен. Эти гены кодируют в среднем более короткие белки, чем гены в прилежащих районах.

Наши результаты указывают на то, что для районов недорепликации характерен особый генный состав и особые закономерности эволюции.

Глава 7 «Поиск молекулярных механизмов действия белка SUUR – регулятора репликационного тайминга в ПХ СЖ. Новые факторы, влияющие на репликационный тайминг в ПХ».

Исследование связывания белка SUUR *D. melanogaster* с политемными хромосомами в зависимости от стадии клеточного цикла. Мы исследовали динамику связывания белка SUUR с политемными хромосомами слюнных желез в эндоцикле методом непрямого иммуноокрашивания. Стадии S-фазы детектировали при помощи PCNA. Для анализа использовали личинок дикого типа Oregon R и трансгенных линий, сверхэкспрессирующие *SuUR* под нативным либо индуцибельным промотором. Для накопления клеток на стадии ранней S-фазы в корм личинкам Oregon R добавляли гидроксимочевину. Мы показали, что в G-фазе белок SUUR присутствует только в хромоцентре. На

ранних стадиях S-фазы в эухроматиновых районах хромосом появляется множество слабых сигналов SUUR. С течением S-фазы число сайтов связывания SUUR в хромосомах уменьшается и возрастает интенсивность сигналов. В конце S-фазы SUUR выявляется только в районах интеркалярного и прицентромерного гетерохроматина. На всех стадиях дискретного мечения наблюдается значительная корреляция в распределении SUUR и PCNA. Количество белка SUUR в политенных хромосомах слюнных желез на фоне истощения PCNA методом РНК-интерференции значительно снижается. Полученные данные указывали на взаимодействие SUUR с машиной репликации, что было в дальнейшем подтверждено коллегами при помощи независимых методов.

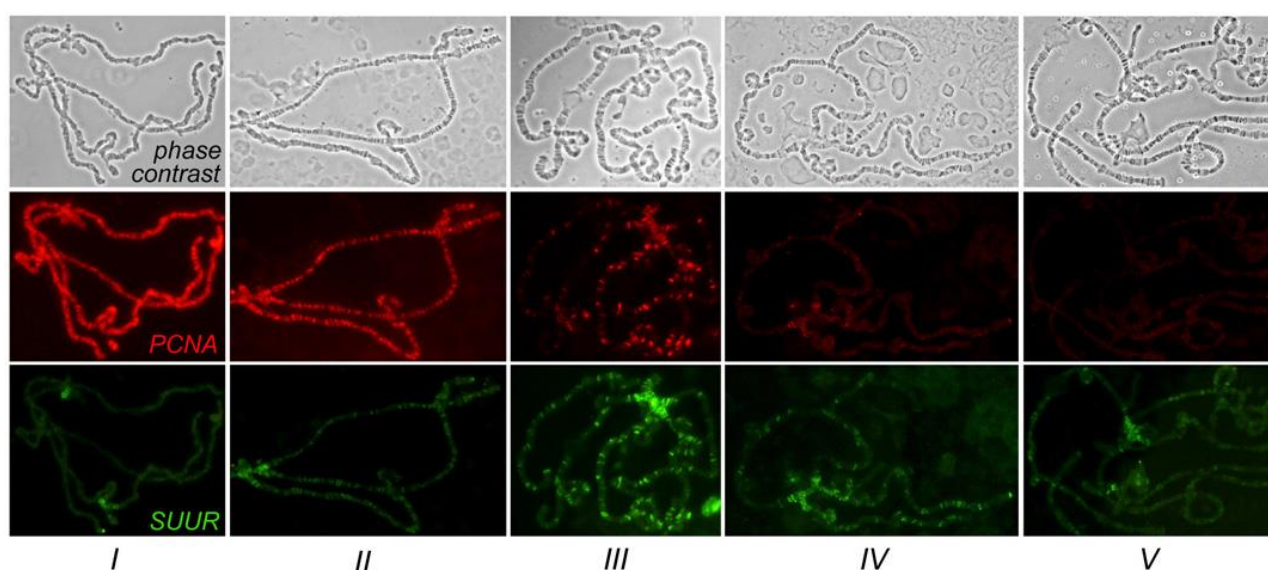


Рисунок 12. Иммунолокализация PCNA и SUUR в политенных хромосомах слюнных желез. I-IV – последовательные стадии S-фазы, V – G-фаза эндочикла.

Исследование влияния белка Rif1 на репликацию гетерохроматиновых районов политенных хромосом. Белок Rif1 является консервативным регулятором репликационного тайминга. Ранее было показано, что у дрозофилы он влияет на недорепликацию в политенных хромосомах (Seller, O'Farrell, 2018, Mubden et al., 2018). Мы проанализировали морфологию политенных хромосом у личинок, несущих мутантные аллели гена *Rif1* и увидели общее увеличение материала в гетерохроматиновых районах. Значительное увеличение хромоцентра косвенно указывало на дополнительную политенизацию в прицентромерном гетерохроматине.

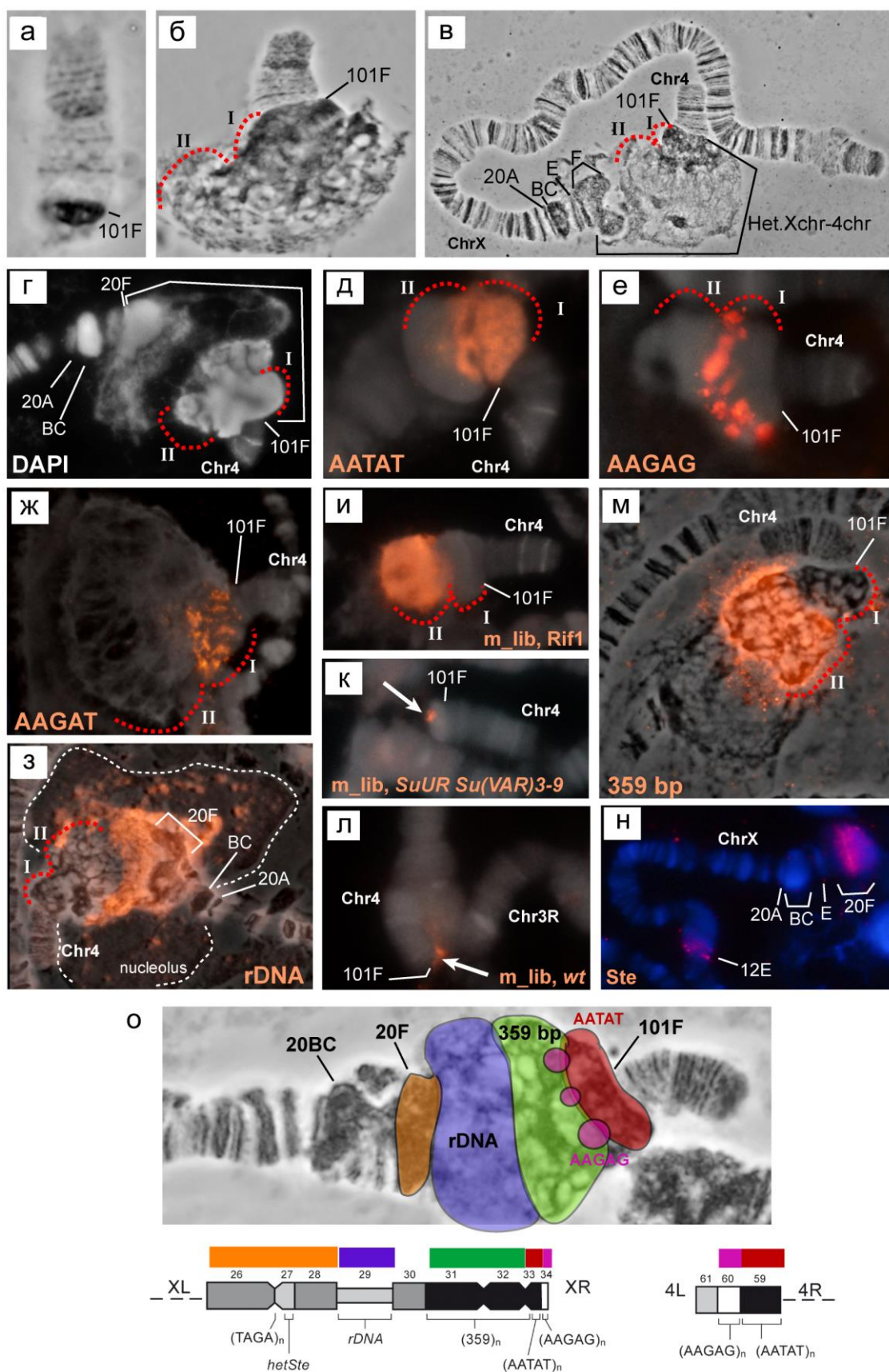


Рисунок 13. Мутации в гене *Rif1* приводят к политенизации сателлитных повторов из проксимального гетерохроматина хромосом X и 4, а также генов рРНК. (а –г) Морфология перичентромерной области хромосомы 4 у контрольной линии *SuUR Su(var)3-9⁰⁶* (а) и у мутантов по гену *Rif1* (б –г). Красные пунктирные дуги указывают

на две зоны разной морфологии в основании хромосомы 4, обозначенные римскими цифрами I и II. Слияние перицентромерных областей хромосом X и 4 обозначено скобками (в,г). Окрашивание ацето-орсеином, фазовый контраст (а – в) и окрашивание DAPI (г). (д –н) Гибридизация *in situ* ДНК-зондов, соответствующих последовательностям гетерохроматина из хромосом X и 4, на политенные хромосомы мутантов по гену *Rif1* (д –и, м,н), *SuUR Su(var)3-9⁰⁶* (к) и личинок дикого типа (л). Пробы, использованные для гибридизации, указаны на рисунке оранжевым цветом; m-lib – микродиссекционная библиотека, белый или синий цвет: окрашивание DAPI; красный цвет: сигнал гибридизации. Белый контур в 3 очерчивает ядрышко. (о) обобщенная схема локализации всех используемых зондов в гетерохроматине хромосом X и 4 в политенной и метафазной хромосомах.

При помощи полимеразной цепной реакции без матрицы мы получили меченые ДНК-зонды к известным для генома дрозофилы сателлитам с короткой единицей повтора (ААГАГ, ААТАТ, ААСАС, ААГАТ, Prodsat (ААТААСАТАГ), DODECA-сателлит). Гибридизация *in situ* полученных проб на ПХ личинок дикого типа, мутантов *SuUR* и мутантов по гену *Rif1* показала, что все крупные блоки сателлитной ДНК существенно сильнее политенизированы у мутантов по гену *Rif1*. У мутантов по гену *Rif1* политенные хромосомы X и 4 как правило формируют единую структуру, объединяясь прицентромерными районами, и в этом объединенном гетерохроматиновом блоке появляется новый материал, по размеру соответствующий эухроматиновой части хромосомы 4. Наши результаты показали, что структура, которая в ПХ выглядит как часть хромосомы 4, соответствует проксимальному ГХ хромосомы X. Проксимальнее сателлита 1.688 в хромосоме X лежат сателлиты ААТАТ и ААГАГ, как и в хромосоме 4. Результаты анализа объединенного гетерохроматина хромосом X и 4 в политенных хромосомах мутантов по гену обобщены на **Рис. 130**.

Когда мы использовали для гибридизации *in situ* зонд к сателлиту ААГАС, который согласно митотической карте локализован в правом плече хромосомы 2 и в хромосоме Y, мы увидели, что в ПХ самцов появляются множественные дополнительные сигналы, локализованные в гетерохроматиновой структуре, не соответствующей никаким структурам, виденным нами у самок. Мы предположили, что эта структура – политенизированная в ПХ хромосома Y. Для доказательства политенизации хромосомы Y мы локализовали зонд, соответствующий повторам *Stellate*, который также у самцов мутантных по *Rif1* показал дополнительный сигнал. Ни один из ранее исследованных генотипов не позволял визуализировать хромосому Y в политенных хромосомах *D. melanogaster*.

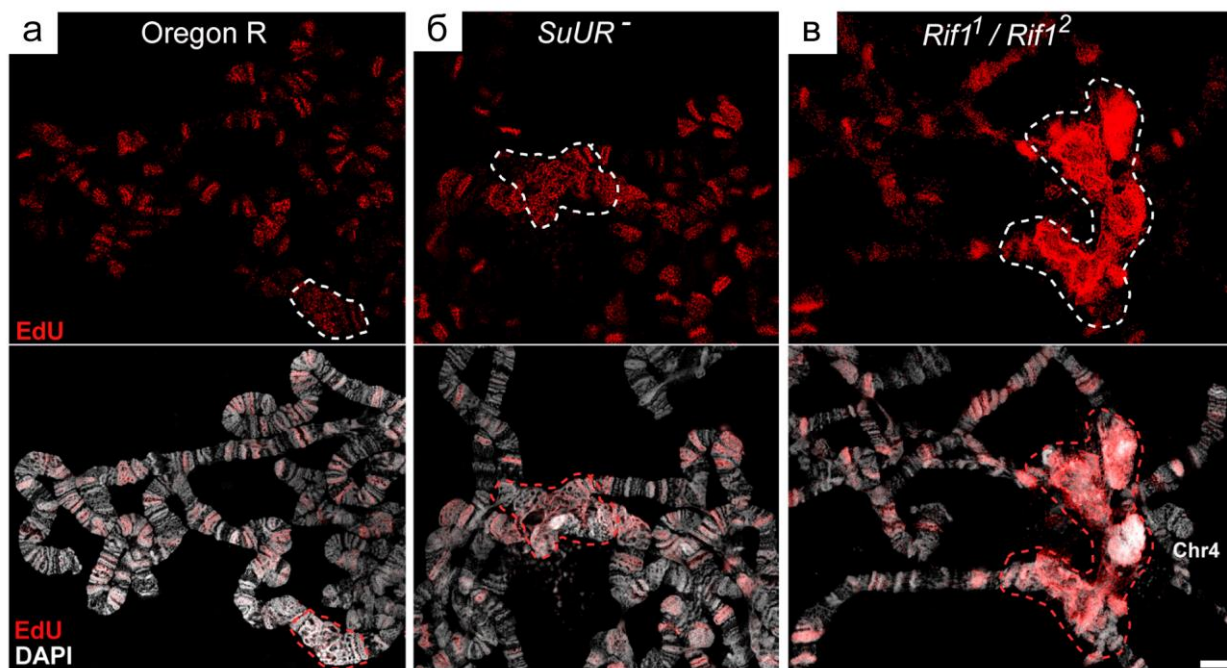


Рисунок 14. Анализ паттернов поздней репликации в политенных хромосомах личинок дикого типа (а) мутантов *SuUR^{ES}* (б) и *Rif1¹/Rif1²* (в) с использованием микроскопии 3D-SIM. Пунктирными линиями обозначены хромоцентры. Масштаб 5 мкм.

Известно, что белок Rif1 участвует в регуляции поздней репликации сателлитной ДНК в эмбриогенезе (Seller, O'Farrell, 2018). Можно было бы ожидать, что у мутантов *Rif1* сателлитная ДНК будет реплицироваться намного раньше, чем у контрольных личинок. Чтобы проверить это предположение, мы провели включение меченого аналога тимидина EdU в изолированные слюнные железы мутантов по гену *Rif1*. Мы увидели набор репликационных паттернов, очень похожий на набор паттернов в контрольных линиях (линии дикого типа и мутантах *SuUR*). У мутантов *Rif1* сигнал EdU в хромоцентре, так же как и в контрольных линиях, отсутствует в ранней S-фазе, появляется в средней S-фазе и сохраняется до конца S-фазы. В то же время было одно существенное отличие - очень высокая интенсивность сигнала EdU в хромоцентре во время поздней S-фазы (Рис. 12). Также были обнаружены стадии очень поздней репликации, при которых сигнал обнаруживается только в хромоцентре. Такие стадии не характерны для политенных хромосом дикого типа, но описаны для мутантов *SuUR*. Мы провели детальный анализ последовательности репликации отдельных морфологических структур в прицентромерных районах всех хромосом и сделали вывод, что у мутантов *Rif1* транскрипционно активные области гетерохроматина реплицируются рано, в то время как основная часть гетерохроматина входит в репликацию на стадии средней и поздней репликации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог, можно сказать, что ПХ не теряет своей актуальности как модельный объект для исследования процессов, происходящих в хроматине. Наши разработки по картированию дисков ПХ, детальному анализу паттернов репликации и соотношению цитологических данных с геномной картой дрозофилы делает ПХ очень удобной моделью для исследования динамики связывания белков с хромосомами в ходе S-фазы.

Результаты работы позволили обобщить и переосмыслить большой массив имеющихся к настоящему времени данных по доменной организации хроматина и репликации в хромосомах дрозофилы. Мы показали, что дисковый рисунок политенных хромосом отражает деление генома *Drosophila* на два глобальных типа доменов с контрастными свойствами, которое консервативно в разных тканях. Эти два типа доменов соответствуют разным морфологическим структурам ПХ – черным дискам и интервалам между ними, представленным чередованием серых дисков и междисков. Черные диски ПХ, характеризующиеся наличием хроматина *guby*, соответствуют 60% эухроматиновой части хромосомы 2R, по размеру они лежат в диапазоне 15-500 тпн. Черные диски характеризуются низкой плотностью генов и содержат преимущественно тканеспецифические гены. В разных тканях они представлены молчащими типами хроматина. Чередование в геноме дрозофилы таких доменов и их характерные размеры определяют пространственно-временную организацию репликации у дрозофилы и лежат в основе обнаруженного нами сходства репликационного тайминга между клетками слюнных желез и диплоидными клетками. Оказалось, что в этих типах клеток инициация репликации приурочена к одним и тем же зонам инициации, которые соответствуют доменам хромосом, обогащенным генами домашнего хозяйства и повсеместно активному хроматину. Между ними лежат хроматиновые домены, где преобладают тканеспецифичные гены, где почти отсутствуют события инициации репликации, и репликация идет преимущественно от краев к середине. Такой характер репликации приводит к зависимости между размером домена молчащего хроматина и временем окончания его репликации. Это существенно отличает дрозофилу от млекопитающих: если у млекопитающих репликационный домен соответствует множеству репликонов, и ключевую роль в организации репликационного тайминга играет распределение в геноме и время активации ранних и поздних ориджинов, то у дрозофилы, при общем сходстве механизмов инициации репликации и факторов, на инициацию

влияющих, характерный размер репликационного домена сопоставим с размером репликона. Поэтому само понятие «репликационного домена» меняет смысл.

Вероятно, важнейшим различием при сравнении репликации в ПХ и диплоидных клетках является различие в скорости репликации во время поздней S-фазы – существенная часть генома не успевает реплицироваться при сопоставимой длине S-фазы. Скорость репликации у дрозофилы зависит от белка SUUR (Sher et al, 2012; Nordman et al, 2014). Мы показали, что и в ПХ слюнных желез, и в диплоидных клетках все гб-диски обогащены белком SUUR. Более того, присутствие этого белка маркирует границы гб-дисков. По данным (Pokholkova et al, 2015) локального искусственного привлечения белка SUUR в район ранней репликации ПХ достаточно для задержки репликации в зоне локализации белка. Можно полагать, что этот белок играет важную роль в задержке репликации, ассоциированной в геноме со всеми гб-дисками. Обобщая наши данные и данные других исследователей, опубликованные в последние несколько лет, вырисовывается картина, что белок SUUR во время S-фазы привлекается в хроматиновые домены, где накапливается синтезированный в начале S-фазы гистон H1. Там SUUR непосредственно связывается с компонентами репликационной вилки и привлекает туда белок Rif1, который, в свою очередь, привлекает фосфатазу PP1, которая фосфорелирует репликативную геликазу, тем самым управляя временем активации ориджинов и скоростью движения репликационных вилок. Существенное замедление репликационных вилок в районах ИГХ ПХ приводит к недорепликации ДНК и, как следствие, к накоплению двунитевых разрывов. С чем связан более выраженный эффект на скорость репликации SUUR в политенных хромосомах по сравнению с диплоидными клетками, еще предстоит выяснить. Белок Rif1 в ПХ имеет и независимый от белка SUUR эффект на репликацию ДНК: в прицентромерном гетерохроматине мутантов по гену *Rif1* происходит дополнительная политенизация наиболее крупных блоков сателлитной ДНК. Данные по импульсному включению EdU в политенные хромосомы указывают на то, что у мутантов *Rif1*, как и у дикого типа, большая часть гетерохроматина реплицируется во время поздней S-фазы. Тем не менее было отмечено значительно увеличенное количество гетерохроматиновых репликонов. Эти результаты говорят о том, что Rif1 регулирует вероятность активации ориджинов репликации в блоках сателлитной ДНК.

Выявлены новые факторы, оказывающие влияние на время репликации и, как следствие, недорепликацию отдельных районов ПХ: гистон H1 и гистонметилтрансфераза Su(VAR)3-9.

Наши результаты указывают на то, что для районов недорепликации политенных хромосом дрозофилы характерен особый генный состав и особые эволюционные тенденции. Эти районы являются зонами с консервативным порядком генов и характеризуются низким уровнем разрывов синтении. Они обогащены высоко консервативными некодирующими последовательностями, что позволяет сформулировать гипотезу о наличии в этих районах сложной сети регуляторных элементов, определяющей высокую консервативность порядка генов в этих районах. Свойство низкой плотности генов в районах ИГХ *D. melanogaster* является эволюционно консервативным. Это позволяет предполагать, что данные блоки сохраняют в эволюции не только порядок генов, но и репрессивный статус хроматина, оставаясь такими же молчащими, поздно реплицируемыми доменами и у других видов дрозофилы. Совпадение дисков ИГХ с топологическими доменами позволяет экстраполировать выводы о консервативности порядка генов в наиболее крупных черных дисках на ТАДы. Сходство организации хроматина между дисками ИГХ и менее крупными черными дисками позволяет предполагать, что выявленные закономерности могут быть характерны как для всех черных дисков, так и для всех ТАДов неактивного типа. Наши результаты показывают тесную связь между репликационным таймингом, организацией генома дрозофилы в физические домены и его эволюцией.

ВЫВОДЫ

1. Разработан подход для установления геномных координат черных дисков политенных хромосом. Получены геномные координаты всех черных дисков хромосомы 2R.
2. Отработаны новые подходы для исследования репликации в политенных хромосомах слюнных желез. Проведено цитологическое картирование сайтов связывания антител к белку PCNA, которое позволило разбить S-фазу эндотикла на 6 субстадий и, соответственно, подразделить черные диски на 6 групп по времени окончания репликации.
3. Показано значительное сходство пространственно-временной организации репликации в политенных хромосомах и хромосомах диплоидных клеток. В обоих типах хромосом интервалы между черными дисками соответствуют зонам ранней инициации репликации, при этом зоны инициации репликации значительно отличаются по эффективности инициации. Внутри черных дисков

события инициации репликации практически отсутствуют, и репликация в них идет преимущественно от краев к середине. Наблюдается корреляция между временем окончания репликации и размером диска. На основании полученных в работе и ранее опубликованных данных построена модель организации репликации в геноме дрозофилы.

4. Показано, что все черные диски политенных хромосом дрозофилы соответствуют участкам генома со свойствами, близкими к свойствам районов интеркалярного гетерохроматина. Черные диски и интервалы между ними достоверно отличаются по плотности распределения генов, их уровню экспрессии и тканеспецифичности. Черные диски обогащены молчащими типами хроматина с резким перепадом маркеров молчащего хроматина белков SUUR, LAMIN, гистона H1, H3K27Me3 на границе диск-интервал, соответствуют ТАДам.
5. Домены поздней репликации характеризуются низким уровнем разрывов синтении, обогащены быстро эволюционирующими генами, кодирующими короткие белки. В то же время, гены, имеющие гомологов у отдаленных видов, кодируют более длинные белки, чем соответствующие гены в прилежащих районах. Районы недорепликации обогащены высоко консервативными некодирующими элементами.
6. Впервые показано, что белок SUUR динамично связывается с хромосомами в эндоцикле. Он появляется в черных дисках политенных хромосом при переходе от ранней к средней S-фазе, при этом его распределение в значительной степени совпадает с распределением PCNA. В поздней S-фазе, когда репликация выявляется только в районах интеркалярного гетерохроматина и хромоцентре, сигналы SUUR наиболее яркие и полностью совпадают с сигналами PCNA. С наступлением фазы G SUUR не выявляются в плечах хромосом. Связывание SUUR с хромоцентром остается неизменным в течение всего эндоцикла. Для связывания SUUR с хромосомами необходим гистон H1.
7. У мутантов по гену *Rif1* происходит дополнительная политенизация крупнейших блоков сателлитной ДНК, в том числе, частично политенизируется хромосома Y. Большая часть гетерохроматина реплицируется во время поздней S-фазы, но значительно увеличивается число гетерохроматиновых репликонов.

8. Показана роль гистона H1 и гистонметилтрансферазы SU(VAR)3-9 в регуляции репликационного тайминга в ПХ СЖ дрозофилы.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. Колесникова Т.Д., Андреева Е.Н., Пиндюрин А.В., Ананько Н.Г., Белякин С.Н., Шлома В.В., Юрлова А.А., Макунин И.В., Похолкова Г.В., Волкова Е.И., Заруцкая Е.А., Кокоза Е.Б., Семешин В.Ф., Беляева Е.С., Жимулев И.Ф. Ген *SuUR* и его участие в организации эпигенетически репрессированных районов хромосом *Drosophila melanogaster* // Генетика. 2006. Т. 42. С. 1013–1028.
2. Belyaeva E. S., Demakov S. A., Pokholkova G. V., Alekseyenko A. A., Kolesnikova T. D., Zhimulev I. F. DNA underreplication in intercalary heterochromatin regions in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* correlates with the formation of partial chromosomal aberrations and ectopic pairing // Chromosoma. 2006. V. 115. P. 355-366.
3. Demakova O. V., Pokholkova G. V., Kolesnikova T. D., Demakov S. A., Andreyeva E. N., Belyaeva E. S., Zhimulev I. F. The SU(VAR)3-9/HP1 complex differentially regulates the compaction state and degree of Underreplication of X chromosome pericentric heterochromatin in *Drosophila melanogaster* // Genetics. 2007. V. 175. P. 609-620.
4. Кокоза Е. Б., Колесникова Т. Д., Зыков И. А., Беляева Е. С., Жимулев И. Ф. Обратимая деконденсация гетерохроматиновых районов политенных хромосом *D. melanogaster* при эктопической экспрессии гена *SuUR* // ДАН. 2009. Т. 425. № 3. С. 421-423.
5. Pindyurin A. V., Boldyreva L. V., Shloma V. V., Kolesnikova T. D., Pokholkova G. V., Andreyeva E. N., Kozhevnikova E. N., Ivanoschuk I. G., Zarutskaya E. A., Demakov S. A., Gorchakov A. A., Belyaeva E. S., Zhimulev I. F. Interaction between the *Drosophila* heterochromatin proteins SUUR and HP1 // J Cell Sci. 2008. V. 121. P. 1693-1703.
6. Yurlova A. A., Makunin I. V., Kolesnikova T. D., Posukh O. V., Belyaeva E. S., Zhimulev I. F. Conservation of domain structure in a fast-evolving heterochromatic SUUR protein in drosophilids // Genetics. 2009. V. 183. P. 119-129.
7. Колесникова Т. Д., Демаков С. А., Иванкин А. В., Андреевкова Н. Г., Жимулев И. Ф. Скорость движения репликационных вилок в политенных

хромосомах слюнных желез *Drosophila melanogaster* не зависит от мутации *Suppressor of UnderReplication* // ДАН. 2009. V. 427. P. 122-125.

8. Колесникова Т. Д., Демаков С. А., Иванкин А. В., Жимулев И. Ф. Метод молекулярного комбинга в исследовании организации геномов и репликации ДНК // Генетика. 2010. Т. 46, № 10. С. 1409–1412.
9. Жимулев И. Ф., Беляева Е. С., Андреева Е. Н., Андреевкова Н. Г., Бабенко В. Н., Белякин С. Н., Болдырева Л. В., Брусенцова И. В., Демаков С. А., Демакова О. В., Зыков И. А., Кокоза Е. Б., Колесникова Т. Д., Максимов Д. А., Макунин И. В., Пиндюрин А. В., Семешин В. Ф., Хорошко В. А. Интеркалярный гетерохроматин в геноме дрозофилы // Генетика. 2010. Т. 46. № 10. С. 1405–1408.
10. Иванкин А. В., Колесникова Т. Д., Демаков С. А., Андреевков О. В., Андреевкова Н. Г., Жимулев И. Ф. Метод молекулярного комбинга в исследовании параметров репликации ДНК в изолированных органах *Drosophila melanogaster* // Цитология. 2011. Т. 3. № 1. С. 75-82.
11. Kolesnikova T. D., Semeshin V F., Andreyeva E. N., Zykov I. A., Kokoza E. B., Kalashnikova D. A., Belyaeva E. S., Zhimulev I. F. Induced decondensation of heterochromatin in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes under condition of ectopic expression of the *Supressor of underreplication* gene // Fly (Austin). 2011. V. 5. N. 3. P. 181-190.
12. Belyaeva E. S., Goncharov F. P., Demakova O. V., Kolesnikova T. D., Boldyreva L. V., Semeshin V. F., Zhimulev I. F. Late replication domains in polytene and non-polytene cells of *Drosophila melanogaster* // PLoS One. 2012. V. 7. N. 1. e30035.
13. Колесникова Т. Д., Андреевкова Н. Г., Беляева Е. С., Гончаров Ф. П., Зыкова Т. Ю., Болдырева Л. В., Похолкова Г. В., Жимулев И. Ф. Районы поздней репликации политенных хромосом слюнных желез *Drosophila melanogaster* // 2013. Цитология. Т. 55. № 3. С. 178–180.
14. Колесникова Т. Д. Механизмы пространственно-временной регуляции репликации // Молекулярная биология. 2013. Т. 47. № 1. С. 12–37.
15. Kolesnikova T. D., Posukh O. V., Andreyeva E. A., Bebyakina D. S., Ivankin A. V., Zhimulev I. F. *Drosophila* SUUR protein associates with PCNA and binds chromatin in a cell cycle-dependent manner // Chromosoma. 2013. V. 122. N. 1-2. С. 55-66.
16. Andreyenkova N. G.*, Kolesnikova T. D.*, Makunin I. V., Pokholkova G. V., Boldyreva L. V., Zyкова Т. Yu., Zhimulev I. F., Belyaeva E. S. Late replication

- domains are evolutionary conserved in the *Drosophila* genome // PLoS One. 2013. V. 8. N. 12. e83319. *Equal contribution.
17. Makunin I. V., Kolesnikova T. D., Andreyenkova N. G. Underreplicated regions in *Drosophila melanogaster* are enriched with fast-evolving genes and highly conserved noncoding sequences // Genome Biol Evol. 2014. V. 6. N. 8. P. 2050-2060.
 18. Колесникова Т. Д., Жимулев И. Ф. Комплексный подход к картированию поздно реплицирующихся дисков политенных хромосом в геноме дрозофилы // Цитология. 2016. Т. 58. С. 262-266.
 19. Andreyeva E. N.*, Bernardo T. J.*, Kolesnikova T. D.*, Lu X., Yarinich L. A., Bartholdy B. A., Guo X., Posukh O. V., Heaton S., Willcockson M. A., Pindyurin A. V., Zhimulev I. F., Skoultchi A. I., Fyodorov D. V. Regulatory functions and chromatin loading dynamics of linker histone H1 during endoreplication in *Drosophila*. // Genes Dev. 2017. V. 31. P. 603-616. *Equal contribution.
 20. Kolesnikova T. D., Goncharov F. P., Zhimulev I. F. Similarity in replication timing between polytene and diploid cells is associated with the organization of the *Drosophila* genome. // PLoS One. 2018. V. 13. N. 4. e0195207.
 21. Колесникова Т.Д. Дисковый рисунок политенных хромосом как отражение универсальных принципов организации хроматина в топологические домены // Биохимия. 2018. Т. 83. № 4. С. 338-349.
 22. Kolesnikova T. D., Antonenko O. V., Makunin I. V. Replication timing in *Drosophila* and its peculiarities in polytene chromosomes. // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019. Т. 23. № 2. С. 140-147.
 23. Kolesnikova T. D., Kolodyazhnaya A. V., Pokholkova G. V., Schubert V., Dovgan V. V., Romanenko S. A., Prokopov D. Yu., Zhimulev I. F. Effects of mutations in the *Drosophila melanogaster* *Rif1* gene on the replication and underreplication of pericentromeric heterochromatin in salivary gland polytene chromosomes // Cells. 2020. V. 9. N. 6:1501.
 24. Das S., Caballero M., Kolesnikova T., Zhimulev I., Koren A., Nordman J. Replication timing analysis in polyploid cells reveals *Rif1* uses multiple mechanisms to promote underreplication in *Drosophila* // Genetics. 2021. V. 219. N. 3. iyab147.
 25. Kolesnikova T. D., Pokholkova G. V., Dovgan V. V., Zhimulev I. F., Schubert V. Super-resolution microscopy reveals stochastic initiation of replication in *Drosophila* polytene chromosomes // Chrom. Res. 2021. Under review.

Монографии и главы в книгах

26. Колесникова Т. Д. Механизмы эпигенетического наследования // Эпигенетика. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2012. С. 89-106.
27. Колесникова Т. Д. Пространственно-временная программа репликации ДНК. Эпигенетические механизмы регуляции в клеточном цикле и в развитии// Эпигенетика. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2012. С. 107-142.